

Titre: Modélisation dynamique de cultures de cellules CHO produisant un anticorps monoclonal en mode cuvée-alimentée
Title: anticorps monoclonal en mode cuvée-alimentée

Auteur: Julien Robitaille
Author:

Date: 2015

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Robitaille, J. (2015). Modélisation dynamique de cultures de cellules CHO produisant un anticorps monoclonal en mode cuvée-alimentée [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/1714/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1714/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Mario Jolicoeur
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MODÉLISATION DYNAMIQUE DE CULTURES DE CELLULES CHO
PRODUISANT UN ANTICORPS MONOCLONAL EN MODE CUVÉE-
ALIMENTÉE

JULIEN ROBITAILLE
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)

AVRIL 2015

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé

MODÉLISATION DYNAMIQUE DE CULTURES DE CELLULES CHO PRODUISANT UN
ANTICORPS MONOCLONAL EN MODE CUVÉE-ALIMENTÉE

présenté par : ROBITAILLE Julien

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. BERTRAND François, Ph. D., président

M. JOLICOEUR Mario, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. HENRY Olivier, Ph. D., membre

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord débiter en remerciant le Pr. Mario Jolicoeur qui m'a proposé mon sujet de recherche pour ce mémoire et qui m'a encadré et guidé tout au long de ce parcours. Merci également de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet et d'avoir su me guider tout en me donnant la latitude nécessaire pour réussir.

J'aimerais également remercier Jingkui Chen qui m'a énormément aidé pour la partie expérimentale de ce mémoire, notamment pour les analyses chimiques. J'aimerais aussi remercier Jean-François Naud qui m'a énormément aidé dans le cadre de son projet de fin d'études pour les cultures en bioréacteur. Un merci spécial aussi à tous mes collègues pour leur appui, leur supports et leurs conseils.

J'aimerais également en profiter pour remercier le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et le Monoclonal Antibody Network (MabNet) pour le soutien financier nécessaire à ce projet. J'aimerais également remercier tous les membres du MabNet pour leurs conseils et leur support, en particulier le Dr. Yves Durocher, qui a prêté la lignée cellulaire utilisée dans le cadre de ce projet.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille et mes amis qui m'ont supporté tout au long de ce projet qui se termine.

RÉSUMÉ

La production d'anticorps monoclonaux par culture de cellules de mammifères est une technologie désormais établie industriellement qui a évolué énormément au cours des dernières décennies. En progressant par expérimentation et par intuition, des améliorations importantes ont été accomplies concernant la productivité des cultures et la croissance des cellules CHO, mais les niveaux de productivité et de reproductibilité sont variables d'un bioprocédé à l'autre. En parallèle, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude du métabolisme de ces cellules afin d'en relever les réactions limitantes et ainsi d'optimiser les conditions de culture. En combinant à la fois ces connaissances sur le métabolisme et les résultats observés en bioréacteurs, il a été possible d'optimiser les stratégies d'alimentation et ainsi d'optimiser la composition du milieu de culture en cours de culture, en mode cuvée-alimentée. Ces travaux ont généralement fait appel à une série de cycles d'essais/erreurs guidés par l'intuition ainsi que par des plans expérimentaux très lourds à mettre en œuvre. Toutefois, l'analyse du métabolisme cellulaire et l'optimisation d'un procédé nécessitent idéalement des outils qui sont à la fois descriptifs et prédictifs, permettant aussi bien d'analyser les résultats expérimentaux que d'explorer des pistes de solution quant à l'optimisation du bioprocédé. C'est dans cette optique de développement d'un modèle mathématique qui satisfait à ces conditions que s'inscrit ce mémoire.

Dans le corps de ce travail, un modèle dynamique du métabolisme de cellules CHO est présenté et analysé. Ce modèle utilise comme entrées uniquement les conditions initiales d'une culture, c'est-à-dire les concentrations initiales extracellulaires et intracellulaires en nutriments et métabolites, afin de simuler les profils de concentrations de ces composés (intracellulaires et extracellulaires), en plus de la concentration cellulaire et la production d'anticorps dans le temps. Un tel modèle dynamique devrait également permettre de simuler les nombreux flux métaboliques en jeu. Le modèle est basé sur la description des flux métaboliques par des équations représentant des mécanismes biochimiques connus et sur la stœchiométrie du métabolisme central du carbone, incluant la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques, la voie des pentoses phosphates, le métabolisme des acides aminés) et du métabolisme énergétique de la cellule. Le modèle a été adapté à partir de travaux précédents de modélisation du métabolisme d'une autre lignée de cellules CHO, et a été construit de manière à pouvoir simuler efficacement le métabolisme face à des perturbations du milieu extracellulaire, particulièrement

par rapport à des variations de compositions du milieu initial et par rapport à l'application de différentes stratégies d'alimentation en cours de culture (i.e. mode cuvée-alimentée).

Afin d'assurer la robustesse de la structure (i.e. réseau métabolique) du modèle ainsi qu'une estimation adéquate des valeurs des paramètres cinétiques, le modèle a été calibré à partir de quatre cultures en bioréacteurs. Ces cultures ont été effectuées en utilisant deux milieux différents, une culture en mode cuvée et une culture en mode cuvée alimentée pour chaque milieu. Une analyse de sensibilité a été effectuée pour identifier les 20 paramètres les plus sensibles du modèle et les valeurs de ceux-ci ont été optimisées de manière à réduire l'écart entre les simulations et les valeurs expérimentales. Cet exercice a de plus permis de localiser les voies métaboliques où œuvrent les paramètres les plus importants. L'exercice d'optimisation a été effectué en utilisant l'ensemble des cultures réalisées, puis a été répété en utilisant différents sous-ensembles de paramètres, soit : seulement les cultures en mode cuvée, seulement les cultures en mode cuvée alimentée, ainsi que selon le milieu de culture utilisé. La comparaison des valeurs de paramètres obtenues et leur intervalle de confiance (95 %) a permis de déterminer qu'un seul ensemble de paramètres est suffisant pour décrire les cultures de CHO indépendamment du mode de culture ou du milieu de culture utilisé. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque l'on a comparé l'erreur globale de simulation des quatre cultures, soit en divisant ces dernières en deux phases successives (phase exponentielle, puis plateau) et en utilisant d'un seul bloc l'ensemble de chacune des cultures sans changement de paramètres. En outre, l'analyse des flux métaboliques effectuée, par simulations, a permis de constater que le métabolisme cellulaire est généralement très robuste et est peu affecté par les perturbations extérieures testées ici. Ces résultats permettent de confirmer l'applicabilité du modèle pour comparer différents types de milieux de culture et de stratégies d'alimentation. Le modèle proposé dans le cadre de ce mémoire de maîtrise est donc utile puisqu'il permet de prédire le comportement de cellules CHO selon différentes stratégies de cultures, ouvrant la voie pour des applications utiles à la planification d'expérience et à l'optimisation de bioprocédés de production.

ABSTRACT

The production of monoclonal antibody (mAb) by mammalian cell culture is now a well established technology, after decades of intensive research. Significant improvements have been achieved through experimentation at all bioreactor scales, mainly based on intuition, enabling current production bioprocesses reaching high productivity while maintaining high cell concentration for extended time. Indeed, a significant amount of work has been made studying and describing CHO cell metabolism, identifying metabolic traits associated to culture behaviour. Combining these knowledge on cell metabolism and from bioreactor cultures, it was possible to optimize culture media composition as well as bioreactor culture feeding strategies. However, bioprocess productivity and reproductivity level vary among biosystems. Indeed, an efficient analysis of cell metabolism and process optimization require tools that can be descriptive and predictive, proposing optimized solutions and analyzing experimental results . With that in mind, the present masters thesis' aim was to propose a mathematical model that satisfies those criteria.

A dynamic model of CHO cells metabolism is thus presented in this thesis, calibrated, analyzed and challenged with experimental data. The model, having as only input the culture initial conditions such as the extracellular and intracellular concentrations of nutrients and metabolites, simulates the concentration profiles of metabolites (intracellular and extracellular), cell growth, antibody production as well as metabolic flux dynamics. The model includes the kinetic description of the metabolic flux rates by equations derived from known biochemical mechanisms, and mass balances based on the stoichiometry of the cell's central carbon metabolism including glycolysis, TCA cycle, pentose phosphate pathway amino acid metabolism, mAb synthesis and energetic metabolism. The model presented here represents a further development from previous work on the modeling of another CHO cell line. It is specifically designed to simulate the effect of environmental disturbances such as variations of the initial medium compositions and of nutrients feeding strategies.

In order to fine-tune the model structure as well as the values of the kinetic parameters, the model was calibrated on four different bioreactor cultures. Batch and fed-batch cultures were performed using two different media. A sensitivity analysis was performed on model parameters of which 20 were identified as the most sensitive ones, which values have been optimized to minimize the simulation error with respect to experimental data. This was also helpful to identify the metabolic

pathways affected by the most sensitive parameters. The model parameter values optimization step was performed following various strategies: using experimental data of all cultures, and distinct data subsets such as batch or fed-batch cultures only, and for each culture media. Studying confidence intervals (95%) of model parameter values determined from each data sets, we show that a limited set of model parameters could describe CHO cultures irrespectively to the medium composition or the batch and fed-batch strategy. Similar conclusion can be drawn dividing the culture into exponential growth and plateau phases, estimating distinct parameter values in each phase, versus a model that simulates the entire culture without any parameters change. The resulting model was then used to perform a dynamic metabolic flux analysis, which revealed that the metabolism of the recombinant CHO cell line in this study is highly robust and highly regulated; the external perturbations having little effect on flux distribution. This work thus confirms the applicability of the dynamic model as an *in silico* platform to study different types of culture media and medium feeding strategies. The model could be used to help plan experiments or to optimize culture process.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIII
LISTE DES ANNEXES.....	XVII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	5
1.1 Production d'anticorps monoclonaux par cellules CHO	5
1.1.1 Production d'anticorps monoclonaux à l'échelle industrielle	5
1.1.2 Utilisation des cellules CHO comme plateforme de production	8
1.1.3 Modes de culture.....	12
1.1.4 Stratégies d'alimentation employées pour le mode cuvée alimentée	15
1.2 Métabolisme des cellules de mammifères.....	19
1.2.1 Survol de la physiologie des cellules CHO.....	20
1.2.2 Voies du métabolisme central du carbone	22
1.2.3 Métabolisme énergétique	28
1.2.4 Régulation du métabolisme.....	32
1.3 Approches de modélisation du métabolisme.....	34
1.3.1 Approches de modélisation des vitesses réactionnelles des flux métaboliques.....	34
1.3.2 Méthodes d'analyse du métabolisme.....	38

1.3.3	Approches de modélisation des cultures en mode cuvée-alimentée	42
CHAPITRE 2 ARTICLE 1: A SINGLE DYNAMIC METABOLIC MODEL CAN DESCRIBE MAB PRODUCING CHO CELL BATCH AND FED-BATCH CULTURES ON DIFFERENT CULTURE MEDIA.....		
		45
2.1	Présentation de l'article.....	45
2.2	Abstract	46
2.3	Introduction	46
2.4	Material and Methods.....	48
2.4.1	Cultures	48
2.4.2	Analytical methods	50
2.4.3	Model structure	51
2.4.4	Mathematical description of the fluxes.....	53
2.4.5	Sensitivity analysis.....	54
2.4.6	Parameter estimation and confidence intervals.....	55
2.5	Results and Discussion.....	56
2.5.1	The culture medium is a primary factor in cell culture behaviour.....	56
2.5.2	Sensitive parameters are of glycolysis regulation, the energetic metabolism and V_{max} 's	58
2.5.3	A single set of parameters allows describing cell behaviour for various culture conditions	60
2.5.4	A single set of parameters allows describing exponential and plateau growth phases	64
2.5.5	Fed-batch culture mode enables maintaining cell metabolic activity	67
2.5.6	Fed-batch culture condition enhances the stability of metabolic flux ratios.....	70
2.5.7	Amino acids metabolism limits growth in the latter phases of the culture	72

2.6	Conclusion.....	74
2.7	Acknowledgment	74
2.8	References	74
2.9	Supporting information	80
CHAPITRE 3 DISCUSSION GÉNÉRALE		102
3.1	Effets du milieu et de l'alimentation sur les résultats obtenus	102
3.2	Structure du modèle adaptée au mode cuvée alimentée.....	104
3.3	Validité du modèle	106
CONCLUSION		109
BIBLIOGRAPHIE		111
ANNEXES		122

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Composition typique d'une cellule de mammifère	22
Tableau 1.2: Rendement en ATP des coenzymes réduites par les réactions cataboliques.....	31
Tableau 1.3: Rendement énergétique des différentes voies métaboliques	31
Tableau 1.4: Équations d'inhibition et d'activation	36
Tableau 1.5: Équations du taux de croissance spécifique	37
Tableau 2.1: Sensitivity analysis for the selected parameters	59
Tableau 2.2: Reactions of the metabolic model	83
Tableau 2.3: Kinetic rate equations	85
Tableau 2.4: State variable and initial conditions	89
Tableau 2.5: Parameter values	91
Tableau 2.6: Parameter values for the 20 most sensitive parameters for different media and culture modes	97
Tableau 2.7: Parameter values for the most sensitive parameters for different growth phases	98
Tableau 2.8: Metabolic fluxes at 48 and 96 h (Batch cultures).....	99
Tableau 2.9: Metabolic fluxes at 48 and 96 h (Fed-batch cultures).....	100
Tableau 2.10: Metabolic flux ratios at 48 and 96 h.....	101
Tableau 3.1: Compositions initiales des milieux de culture.....	103

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Structure d'un anticorps	6
Figure 1.2 Culture en mode cuvée et cuvée alimentée.....	13
Figure 1.3 Culture en mode perfusion.....	14
Figure 1.4 Compartimentation de la cellule	20
Figure 1.5 Métabolisme central du carbone	23
Figure 1.6 Résumé de la glycolyse.....	24
Figure 1.7 Cycle des acides tricarboxyliques.....	26
Figure 1.8 Phosphorylation oxydative	30
Figure 1.9 Régulation de la glycolyse	33
Figure 1.10 Activation non essentielle.....	36
Figure 1.11 Exemple d'analyse des flux métaboliques	39
Figure 2.1 Metabolic network described by the model.....	52
Figure 2.2 Experimental and model simulation results for cells and major extracellular components.....	57
Figure 2.3 Experimental and model simulation results for major extracellular amino acids.....	58
Figure 2.4. Experimental and model simulation results for major intracellular components.	62
Figure 2.5. Parameters estimates with confidence intervals for different media and culture modes.	63
Figure 2.6. Parameters estimates with confidence intervals for different growth phases.	65
Figure 2.7. Model simulation of metabolic fluxes.	68
Figure 2.8. Model simulations of the metabolic ratios.....	71
Figure 2.9. Experimental and model simulation results for intracellular nucleotides.....	80
Figure 2.10. Experimental and model simulation results for intracellular metabolites	81
Figure 2.11. Experimental and model simulation results for extracellular amino acid	82

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACCOA	Acétyl Coenzyme A
ADP	Adénosine diphosphate
AK	Adénylate kinase
AKG	Alpha-cétoglutarate
AKGDH	Alpha-cétoglutarate déhydrogénase
ALA	Alanine
AlaTA	Alanine aminotransférase
AMP	Adénosine monophosphate
ARG	Arginine
ASN	Asparagine
ASP	Aspartate
ASTA	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine triphosphate
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIT	Citrate
CS	Citrate synthase
DHFR	Dihydrofolate réductase
EGLC	Glucose extracellulaire
EGLN	Glutamine extracellulaire
EGLU	Glutamate extracellulaire
EP	Ribose-5-phosphaste épimérase

FBA	<i>Flux Balance Analysis</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
F6P	Fructose-6-phosphate
G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
G6PDH	Glucose-6-phosphate déhydrogénase
GAP	Glyceraldéhyde-3-phosphate
GLC	Glucose
GLN	Glutamine
GlnT	Glutamine synthétase
GLDH	Gltamate déhydrogénase
GLU	Glutamate
GLY	Glycine
HIS	Histidine
ILE	Isoleucine
LAC	Lactate
LDH	Lactate déhydrogénase
LYS	Lysine
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
MCA	<i>Metabolic Control Analysis</i>
MFA	<i>Metabolic Flux Analysis</i>
MAL	Malate
MLD	Malate déhydrogénase
MTX	Méthotrexate

NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)
NADHP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
OXA	Oxaloacétate
PC	Pyruvate carboxylase
PDH	Pyruvate déhydrogénase
PEP	Phosphoenolpyruvate
PHE	Pheynylalanine
PFK	Phosphofructokinase
PGI	Phosphoglucose isom.rase
PGK	Phosphoglycérate kinase
PK	Pyruvate kinase
PRO	Proline
PYR	Pyruvate
R5P	Ribose-5-phosphate
SDH	Succinate déhydrogénase
SER	Serine
SUC	Succinate
TCA	Acides tricarboxyliques
TK	Transketotase
TYR	Tyrosine

VAL	Valine
X5P	Xylose-5-phosphate

LISTE DES ANNEXES

Annexe A - Effet de l'ajout de différents nutriments sur la concentration finale en anticorps ... 122

INTRODUCTION

Les produits biopharmaceutiques se distinguent des molécules pharmaceutiques classiques par le fait qu'ils sont produits par des entités biologiques, contrairement aux produits pharmaceutiques traditionnels synthétisés par voies chimiques. L'utilisation de plateformes biologiques permet la fabrication de molécules complexes qui nécessiteraient un nombre d'étapes de synthèse trop élevées par chimie traditionnelle. Les premiers produits biopharmaceutiques ont été fabriqués sur les plateformes biologiques les plus simples, les bactéries et les levures (Porro et al., 2011), leur utilisation par l'homme remontant à plusieurs siècles. Cependant, la mise au point de techniques recombinantes, par insertion d'ADN sur des vecteurs plasmidiques, a permis, par transfection, de produire de l'insuline humaine par la bactérie *E. coli* dès 1973 (Cohen et al., 1973), éventuellement approuvée par la FDA. Chez les cellules eucaryotes, ces techniques de modifications génétiques ont permis, au début des années 80, l'apparition des premières protéines recombinantes pouvant être utilisées pour des fonctions thérapeutiques. La première d'entre elles a été le t-PA (*tissue plasminogen activator*) (Kaufman et al., 1985), qui a été, en 1987, la première protéine recombinante issue de cellules animales approuvée par la FDA. De nombreuses autres protéines recombinantes ont été approuvées par la suite, dont les anticorps monoclonaux (*mAb*), qui représente aujourd'hui la classe de protéines recombinantes ayant le plus grand succès commercial avec plus de 50% de part de marché des agents thérapeutiques attribués largement à des variantes d'une seule plateforme, soit les cellules de hamster chinois (CHO) (Walsh, 2010).

L'arrivée sur le marché de ce type de molécule extrêmement complexe s'est donc appuyée sur le développement d'une nouvelle plateforme de production, soit les cellules animales dont en très grande majorité les cellules de mammifère. Cependant, à l'origine (~ 1980) la productivité des cellules de mammifère en culture ne dépassait pas 50 mg/L d'anticorps (Wurm, 2004), ce qui ne suffisait pas à la demande appréhendée. De nombreux progrès ont ainsi été réalisés au cours des années qui ont suivi afin d'atteindre des niveaux de productions dépassant maintenant généralement, mais pas systématiquement, le gramme par litre (Kelley, 2009). D'une part, l'optimisation du processus de transfection, d'amplification du gène et de sélection des lignées afin d'isoler les plus productives, permet de nos jours d'obtenir rapidement (~ mois) des lignées cellulaires présentant une productivité spécifique en anticorps et un taux de croissance soutenu élevés. D'autre part, l'amélioration du procédé, en particulier l'optimisation de la composition des

milieux de culture sans sérum bovin, source de facteurs de croissance, et l'optimisation des stratégies d'alimentation (Bandaranayake et al., 2014), ont permis de faire des gains significatifs quant à la quantité de cellules viables atteintes et la durée des cultures, améliorant la quantité totale d'anticorps monoclonaux obtenus.

Bien que l'utilisation de stratégies d'alimentation complexes ait permis d'améliorer le processus de culture des cellules de mammifères, ces progrès sont intimement limités par de nouvelles contraintes issues des augmentations de densité cellulaire. En effet, les sous-produits du métabolisme, principalement l'ammonium et le lactate (Z. Xing et al., 2008) exercent un effet inhibiteur sur la croissance des cellules de mammifères. L'accumulation de ces sous-produits provient du métabolisme inefficace des cellules CHO et autres qui les rejettent dans leur milieu en consommant et convertissant les nutriments mis à leur disposition. Pour pallier à ce problème, plusieurs solutions ont été développées suite à l'utilisation de vastes plans d'expérience pour le développement de milieux de culture mieux définis afin de minimiser l'accumulation de lactate et d'ammonium, en amenant les cellules vers un état métabolique plus efficace face à l'utilisation des ressources nutritionnelles. Il est possible en effet d'opérer à de basses concentrations de nutriments (L. Li et al., 2005) ou d'effectuer des substitutions de nutriments, tel la substitution du glucose par le galactose ou de la glutamine par le glutamate (C. Altamirano et al., 2004) afin d'obtenir un métabolisme plus efficace énergétiquement qui limite la production de lactate et d'ammonium.

En parallèle à ces développements, de nombreuses avancées ont été faites chez les cellules de mammifère quant à la compréhension de leur métabolisme. L'analyse des flux métaboliques (MFA) et le "Flux Balance Analysis" (FBA), des techniques d'analyse initialement développées pour les bactéries (Vallino et al., 1990), ont été appliquées avec succès aux cellules CHO (Ahn et al., 2011; Goudar et al., 2010; Sengupta et al., 2011) afin de mieux caractériser leur métabolisme. Ces méthodes permettent d'estimer les flux métaboliques des cellules et leur répartition par rapport aux divers voies métaboliques actives dans une cellule. Cependant, ces techniques mathématiques sont strictement descriptives et peu prédictives. La combinaison de ces méthodes avec un modèle dynamique des concentrations extracellulaires (P. Dorka et al., 2009; Gao et al., 2007; Provost et al., 2006) permet de résoudre en partie ce problème, bien que cette technique nécessite de diviser la modélisation d'une culture selon les phases de croissances. La modélisation dynamique des flux intracellulaires selon les concentrations extracellulaires (Nolan

et al., 2011) ou intracellulaires (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014; Ghorbaniaghdam et al., 2013) de métabolites permet de représenter par simulations de manière plus complète une culture. Cependant, l'utilisation d'un modèle dynamique reposant sur des concentrations intracellulaires et extracellulaires n'a pas encore été appliquée afin d'étudier différentes stratégies de culture. Un tel modèle pouvant démontrer une capacité prédictive serait extrêmement utile à l'industrie dans le développement et l'amélioration de ses pratiques de culture en bioréacteur

Objectifs et méthodologie

L'objectif premier de ce projet a consisté à démontrer la possibilité d'utiliser un modèle dynamique, simulant les concentrations intracellulaires et extracellulaires des métabolites d'une culture, afin de comparer différentes stratégies de culture. Ainsi, un modèle développé précédemment pour une autre lignée de CHO (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014) a été adapté à la lignée d'intérêt ici, et testé avec l'utilisation de différents milieux de cultures, impliquant des conditions initiales différentes, et des stratégies d'alimentation de type cuvée-alimentée, permettant de tester la réponse du modèle suite à des perturbations du milieu externe de culture. Dans une première étape, les paramètres ont été calibrés et sa structure (réseau métabolique, stoéchiométrie) adaptée à une lignée de cellules CHO produisant l'anticorps monoclonal EG2-hFc, lignée étudiée par les chercheurs du Réseau CRSNG MabNet dont notre laboratoire faisait partie. Cette approche d'une calibration du modèle sur différents milieux et pour des cultures en mode cuvée et cuvée-alimentée visait à évaluer l'étendue d'applicabilité d'un tel modèle. De plus, l'analyse des données obtenues, autant les données relatives aux valeurs des paramètres que celles relatives aux valeurs des flux métaboliques et des profils de concentrations obtenus, a permis d'évaluer la performance du modèle sous différentes conditions de milieux et de stratégies d'alimentation.

Organisation du mémoire

Le corps du mémoire est divisé en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à une revue de la littérature portant sur la production d'anticorps monoclonaux par les cellules CHO ainsi que sur les méthodes d'analyse de leur métabolisme. Cette revue abordera tout d'abord la production d'anticorps monoclonaux à l'échelle industrielle, les caractéristiques de cette plateforme de production et les modes de culture courants. Par la suite, l'état actuel des connaissances sur le métabolisme central des cellules CHO sera couvert, puis finalement les méthodes utilisées pour

décrire les vitesses de réaction biochimiques et pour quantifier les flux métaboliques seront passés en revue. Le second chapitre sera constitué d'un article soumis à *PLOS Computational Biology* intitulé «A Single Dynamic Metabolic Model Can Describe mAb Producing CHO Cell Batch and Fed-batch Cultures on Different Culture Media». Ce chapitre présente les principaux résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de ce mémoire ainsi que la structure du modèle métabolique développé et, finalement, l'analyse des principaux résultats obtenus. Un dernier chapitre présentera la discussion générale sur l'ensemble des travaux réalisés. Finalement, le corps de ce mémoire sera suivi d'une conclusion, et des recommandations seront apportées quant à la direction que pourraient prendre de futurs travaux poursuivant ce qui a été amorcé ici.

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

Dans le présent chapitre, une revue de la littérature portera principalement sur la modélisation de cultures en mode cuvée alimentée de cellules CHO. Tout d'abord, il sera question de la production d'anticorps monoclonaux par les cellules CHO, des différents modes de cultures utilisés, et du choix de ces cellules comme plateforme de production en lien avec les caractéristiques des anticorps monoclonaux. Par la suite, le métabolisme des cellules CHO sera couvert avec une emphase sur les voies biochimiques reliant les substrats à la production des anticorps de même qu'à la division des cellules. Finalement, les approches de modélisations permettant de calculer les flux métaboliques seront couvertes, ainsi que les approches utilisées pour modéliser les cultures en mode cuvée alimentée, et finalement, le contexte dans lequel se place ce projet sera exposé.

1.1 Production d'anticorps monoclonaux par cellules CHO

La production à grande échelle d'anticorps monoclonaux à des fins thérapeutiques est somme toute une technologie assez récente. Bien que le premier anticorps monoclonal a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) en 1986 (Waldmann, 2003), l'arrivée massive de ce type de biomolécule sur le marché s'est accélérée au cours des dernières années. En effet, de 2006 à 2010, 13 des 25 nouveaux produits biopharmaceutiques approuvés par la FDA étaient des anticorps monoclonaux (Walsh, 2010). L'arrivée massive de nouveaux produits sur le marché résulte en des thérapies efficaces pour des pathologies complexes, générant ainsi une demande accrue en anticorps monoclonaux et donc une capacité de production devant augmenter à un rythme comparable (Butler, 2005). L'amélioration de la productivité par l'optimisation des cultures, entre autres par le développement du mode de culture cuvée-alimentée, vise ainsi à augmenter la capacité de production globale permettant de répondre à la demande.

1.1.1 Production d'anticorps monoclonaux à l'échelle industrielle

La production d'anticorps monoclonaux à l'échelle industrielle se déroule en plusieurs étapes. Le processus démarre par l'expansion initiale d'un flacon de cellules en suspension qui proviennent d'une banque maîtresse de cellules, puis par l'expansion de la population cellulaire par une série de cultures successives jusqu'à atteindre la plateforme bioréacteur de production, pouvant

représenter plusieurs milliers de litres. Un cycle de production se termine par l'étape de purification. Le processus en entier doit se dérouler en conditions d'aseptie, se conformer aux Bonnes Pratiques de Fabrications (BPF) pour pouvoir être approuvé pour la vente, et doit permettre une production reproductible de protéines tout en conservant leur efficacité thérapeutique.

1.1.1.1. Caractéristiques des anticorps monoclonaux

Les anticorps sont des protéines d'environ 150 kDa en forme de « Y » formées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères plus courtes, comme il est présenté à la Figure 1.1. Ceux-ci peuvent être divisés en plusieurs catégories selon leur chaîne lourde (IgG, IgA, IgD, IgE et IgM), cette dernière catégorie, elle-même subdivisée de IgG1 à IgG4, est la plus utilisée pour la production d'anticorps monoclonaux (Shade et al., 2013) puisqu'il s'agit de la catégorie la plus abondante naturellement. Le haut de l'anticorps, la section Fab (*anti-binding fragments*), est une section comprenant une région qui permet la reconnaissance en se liant spécifiquement à différents antigènes. Cette section comporte des zones variables chez les anticorps, qui sont par définition identiques pour tous les anticorps monoclonaux du même type. La base de l'anticorps, la section Fc (*fragment crystallizable region*), peut se lier à d'autres protéines, tels les récepteurs Fcγ chez les IgG (Zheng et al., 2011) pour accomplir la fonction de l'anticorps.

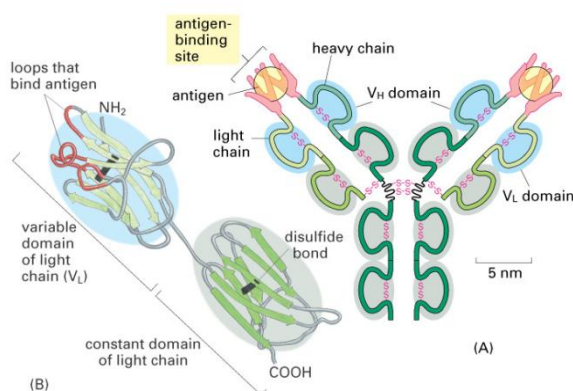


Figure 1.1 Structure d'un anticorps

Tirée de Alberts et al. (2004)

En outre, les anticorps sont des ensembles de protéines généralement glycosylées, c'est-à-dire que des glucides sont liés de façon covalente à certains acides aminés de la chaîne peptidique. En

particulier, la présence d'oligosaccharides sur le segment Fc est essentielle pour que l'anticorps possède une fonction biologique effective (Jefferis, 2005). De plus, les protéines mal glycosylées tendent à être mal repliées, biologiquement inactives ou génèrent des effets secondaires indésirables, et sont rapidement éliminées par l'organisme (J. Zhang, 2010). La qualité de l'anticorps monoclonal dépend donc en partie de son profil de glycosylation et le processus de production doit faire en sorte de s'assurer que ce profil corresponde à celui recherché et est maintenu tout au long des diverses étapes de production, de séparation, de purification et de mise en forme.

1.1.1.2. Production industrielle d'anticorps monoclonaux

La capacité du domaine variable des anticorps monoclonaux à se lier à divers récepteurs et substances explique leur grand potentiel d'un point de vue thérapeutique. Les anticorps monoclonaux peuvent identifier et se lier spécifiquement à différentes cibles, par exemple des cellules tumorales. Entre autres, ils peuvent identifier les cellules tumorales et induire leur apoptose par l'intermédiaire du segment Fc qui est reconnue par le système immunitaire. Ils peuvent aussi servir à identifier les cellules tumorales et à y transporter un agent cytotoxique tel un agent chimiothérapeutique, ou encore reconnaître les récepteurs de facteurs de croissance des cellules tumorales et ainsi empêcher leur prolifération (Jefferis, 2005). Outre le traitement des cancers, ils peuvent être aussi utilisés pour le traitement des maladies auto-immunes et pour effectuer des diagnostics. Leurs multiples usages expliquent la demande pour ce type de produit.

La production d'anticorps monoclonaux à grande échelle se fait généralement dans des cuves en acier inoxydable de grand volume, jusqu'à plus de 20 000 L (Birch et al., 2006; Butler, 2005). Il est possible maintenant de remplacer ces cuves en acier par des réacteurs jetables en plastique agités par vagues (WAVE) ou par des agitateurs. La culture en suspension est favorisée, car il s'agit d'un type de culture bien connu et simple à mettre en place. Pour maintenir les cellules en suspension et permettre un mélange adéquat, les cuves sont généralement agitées. Le pH est contrôlé par ajout de CO₂ et/ou de NaOH, la température est contrôlée généralement à 37 degrés Celsius et le niveau d'oxygène dissous est contrôlé par injection d'air ou d'air enrichi en oxygène (Butler, 2005). En plus d'avoir un impact sur la croissance des microorganismes, les conditions de culture peuvent également affecter la qualité du produit. En effet, la température, le pH, le

niveau d'oxygène ainsi que la concentration en nutriments et en ion ammonium peuvent avoir un impact sur la glycosylation des anticorps (Butler, 2005). Après la phase de production, puisque les anticorps monoclonaux sont des molécules sécrétées, le milieu de culture est tout d'abord centrifugé, puis l'anticorps est récupéré généralement par une chromatographie d'affinité de la protéine A, suivi typiquement d'une chromatographie par échange d'anion et une chromatographie par échange de cation pour terminer par une ultrafiltration qui concentre le produit (Kelley, 2009). Les procédés de purification modernes étant capables de purifier des milieux de culture contenant jusqu'à 5 g/L d'anticorps, une phase de concentration permet de diminuer les coûts associés à la purification.

Les procédés modernes peuvent souvent produire jusqu'à 5 g/L d'anticorps (Birch, et al., 2006; Kelley, 2009; Wurm, 2004), dans certains cas jusqu'à 10 g/L (J. Y. Kim et al., 2012). Les lignées utilisées produisent généralement entre 20 et 80 pg/cellule/jour d'anticorps (Wurm, 2004; J. Zhang, 2010). La production d'anticorps par litre a été multipliée par 100 depuis le début de la production industrielle d'anticorps monoclonaux (Birch, et al., 2006; J. Y. Kim, et al., 2012; Wurm, 2004), une augmentation attribuable à l'augmentation de la productivité spécifique des cellules, à l'atteinte de concentrations de cellules viables plus élevées et l'augmentation de la durée des cultures retardant la phase de mortalité. Ces augmentations ont pu être réalisées, entres autres, en améliorant le procédé de sélection des clones et en améliorant le milieu et le mode de culture. Plus particulièrement, l'optimisation des composantes du milieu de culture et l'optimisation du processus d'alimentation des cultures ont permis de prolonger les cultures et d'en améliorer la concentration cellulaire finale viable. Ces processus reposent en grande partie sur une connaissance du métabolisme cellulaire et de leurs besoins énergétiques.

1.1.2 Utilisation des cellules CHO comme plateforme de production

Étant donné leur complexité, les anticorps monoclonaux ne peuvent être produits par les procédés chimiques traditionnels et doivent être produits par des plateformes cellulaires compétentes pour permettre la glycosylation des protéines. Une variété de plateformes peuvent être utilisées pour produire des protéines telles les bactéries, levures, cellules d'insectes et cellules de plantes, mais dans le cas d'anticorps monoclonaux, en 2009, 24 des 26 produits approuvés par la FDA étaient produits par des cellules de mammifère. D'une manière plus générale, 32 des 58 produits biopharmaceutiques approuvés en 2010 étaient produits par des lignées cellulaires de

mammifères (Walsh, 2010) et 70 % des protéines recombinantes produites par des cellules CHO (Jayapal et al., 2007). L'attrait de ce type de cellules réside dans leur capacité à effectuer des modifications post-traductionnelles complexes similaires à ce qui est observé chez l'humain.

1.1.2.1. Caractéristiques des cellules CHO

Bien que l'usage des hamsters de Chine à des fins de recherche date du début du 20^{ème} siècle, la première culture de cellules de *Chinese Hamster Ovaries* (CHO) isolées est l'œuvre du Dr. Theodore T. Puck en 1957 (Tjio et al., 1958). Le faible nombre de chromosomes et le fait qu'elles soient fonctionnellement hémizygotes pour de nombreux gènes facilitent la recherche; elles ont ainsi été généralement utilisées pour devenir le modèle d'étude des cellules de mammifères comme *Escherichia coli* l'est pour les bactéries (Jayapal, et al., 2007). Deux mutants CHO déficients en enzyme DHFR (Dihydrofolate réductase) ont rapidement été isolés (DXB11 et DG44) et sont maintenant utilisés comme lignées parentales (Jayapal, et al., 2007). Ce système déficient en enzyme DHFR est maintenant utilisé pour faire la sélection des clones transfectés après transfection avec un vecteur portant le gène qui code pour la protéine d'intérêt (Wurm, 2004), permettant d'obtenir des clones possédant de nombreuses copies du gène d'intérêt.

De nombreuses lignées de cellules de mammifère ont été approuvées par la FDA. De celles-ci, les lignées *Baby Hamster Kidney* (BHK-21) et de *Human Embryonic Kidney* (HEK-293) sont surtout utilisées pour la production de virus et de vaccins. Les lignées CHO, NSO, Sp2/O, PER.C6 et les hybridomes murins sont également approuvés pour la production d'anticorps monoclonaux, les cellules CHO comptant pour plus de 40 % de leur production (J. Zhang, 2010). Un taux de croissance et une viabilité plus élevés sur une durée prolongée confèrent un avantage aux CHO comparativement aux NSO, Sp2/O et hybridomes (J. Zhang, 2010). Parmi les autres points forts des CHO, notons: un hôte connu et sécuritaire facile à faire approuver par les organismes de régulation, une possibilité de facilement amplifier un gène d'intérêt pour obtenir une productivité élevée telle qu'expliquée précédemment, une capacité à effectuer des modifications post-traductionnels compatibles à l'humain et une facilité à adapter la lignée à la culture en suspension dans un milieu sans sérum (J. Y. Kim, et al., 2012). Les CHO sont un hôte très connu et plusieurs lignées ont déjà été approuvées à maintes reprises par la FDA, étant utilisés depuis plus de vingt ans. Il s'agit d'un hôte très sécuritaire, la plupart des virus pathogènes pour l'homme ne se répliquant pas dans les cultures CHO (Bandaranayake, et al., 2014). Une vaste quantité

d'information est connue à son sujet, son génome ayant déjà été séquencé pour le clone CHO-K1 (Xu et al., 2011). Finalement, il est relativement aisé de développer rapidement une lignée recombinante CHO. Il faut prévoir maintenant 9 mois pour adapter une lignée CHO adhérente dans un milieu contenant du sérum à la culture en suspension dans un milieu sans sérum et sans produit animal (J. Zhang, 2010). Leur principal attrait est qu'elles peuvent facilement s'adapter à ces conditions de cultures pour croître à de très hautes densités cellulaires, généralement de l'ordre de 10^7 cellules par mL à grande échelle avec une reproductibilité adéquate (Jayapal, et al., 2007). Ces raisons expliquent que, à l'échelle industrielle, les cellules CHO sont habituellement favorisées par rapport aux autres hôtes mammifères disponibles.

La biotechnologie tend toutefois naturellement à favoriser d'autres hôtes par rapport aux cellules de mammifères. Les bactéries, tel que *Escherichia coli*, croissent beaucoup plus vite que les cellules mammifères. *Escherichia coli* a un temps de doublement de 20 à 30 min (Caro, 1970) contre un temps de doublement entre 12 et 28 h pour les cellules CHO (Eibl et al., 2009), ce qui résulte en une productivité volumétrique 10 à 100 supérieures généralement par rapport aux cellules CHO (Jayapal, et al., 2007). De plus, ayant un diamètre 10 à 50 fois plus important que les bactéries, les cellules CHO sont plus sensibles au cisaillement. Elles sont en outre davantage sensibles aux impuretés du milieu et nécessitent des milieux définis très complexes et dispendieux (J. Zhang, 2010). Toutefois, le principal attrait qu'elles ont par rapport aux autres plateformes est qu'elles produisent des anticorps repliés correctement et qui ont des motifs de glycosylation compatibles avec le système immunitaire de l'humain (Butler, 2005; Jayapal, et al., 2007; J. Zhang, 2010). Il est possible de produire des fragments d'anticorps en utilisant *Escherichia coli* (Birch, et al., 2006; J. Zhang, 2010), toutefois les anticorps complets ne sont pas glycosylés en utilisant ce mode d'expression. De plus, les plateformes mammifères ont évolué de telle manière aux cours des dernières décennies qu'elles surpassent maintenant les plateformes bactériennes pour ce qui est de la concentration finale en protéine (Wurm, 2004). Les moisissures telles *Aspergillus niger* et *Trichoderma reesei* sont couramment employées pour produire des enzymes, et il est possible de produire des anticorps monoclonaux complets avec *Aspergillus niger*. La glycosylation n'est pas la même que leur équivalent mammifère, mais permet théoriquement de remplir les mêmes fonctions. Toutefois, il y a de potentiels problèmes d'immunogénicité (Gerngross, 2004). Les mêmes problèmes de glycosylation sont observés chez les cellules d'insectes (Gerngross, 2004; J. Y. Kim, et al., 2012). Il est aussi possible de produire

différents types d'anticorps monoclonaux fonctionnels à partir de cellules de plante telle que le tabac (Medicago Inc, (Abranches et al., 2005)) et la carotte (Protalix Inc, (Wolfson, 2013)), puisqu'elles aussi possèdent la machinerie nécessaire pour effectuer des modifications post-traductionnelles. Toutefois, il s'agit d'un hôte moins connu que les CHO qui est plus difficile, sauf dans de rares exceptions, à faire approuver par la FDA et pour lequel des doutes subsistent quand à l'acceptabilité par l'humain, en plus des faibles rendements généralement observés (Ma et al., 2003). Les cellules de mammifères étant des hôtes sûrs, capables de produire des motifs de glycosylation pour les anticorps reconnus par le système immunitaire de l'humain, celles-ci sont donc majoritairement utilisées aujourd'hui.

1.1.2.2. Milieux de culture

Traditionnellement, les milieux nutritifs utilisés pour la culture de cellules de mammifères ont tenté de reproduire les conditions auxquelles les cellules mammifères sont exposées, par exemple les conditions du sang et de la lymphe. C'est pourquoi aux composés de base (sels, glucides, acides aminés, etc.) était ajoutée une portion de sérum bovin. Ce sérum, en plus de protéger les cellules par l'albumine, permet la croissance rapide des cellules par les différentes hormones et facteurs de croissance présents (Butler, 2005). Toutefois, la variabilité entre les lots de sérums et la possibilité de contamination due à l'origine animale du sérum et la présence de contaminants rendent la purification du produit plus difficile voire problématique face à l'acceptabilité des organismes règlementaires. Ainsi, l'industrie s'est tournée vers des milieux sans sérum et sans composantes animales (Birch, et al., 2006). Ces milieux, aussi appelés milieux définis, sont fabriqués à partir de constituants purs. Cependant, compte tenu d'une connaissance limitée de la composition des sérums, ces milieux définis ont le désavantage de ne pas fournir les mêmes résultats pour toutes les lignées de cellules (Butler, 2005), ce qui fait en sorte que pour chaque lignée et chaque clone un nouveau milieu doit être défini pour obtenir des performances optimales.

Les milieux de culture doivent normalement remplir les fonctions suivantes: fournir les nutriments nécessaires à la croissance des cellules, favoriser la croissance cellulaire, maintenir la pression osmotique dans des conditions acceptables et maintenir le pH près des valeurs physiologiques (Yang et al., 2012). Les nutriments présents sont normalement des acides aminés, des lipides et des monosaccharides, généralement le glucose, en plus de certaines vitamines et

ions servant de cofacteurs pour le métabolisme. Les cellules ont en outre besoin de facteurs de croissance et d'hormones pour favoriser leur croissance. De plus, la présence de sels, en proportions semblables à ce qui est observé dans l'organisme, permet de conserver l'osmolarité du milieu de culture dans la plage acceptable entre 260 et 320 mOsm/kg (Yang, et al., 2012). Une osmolarité plus élevée résulte généralement en un taux de croissance plus faible (Zhu et al., 2005), mais augmente possiblement la production spécifique d'anticorps, n'affectant pas nécessairement la concentration finale obtenue (Cherlet et al., 1999). Le contrôle du pH se fait en utilisant l'effet tampon généré en présence de CO_2 et de HCO_3^- . Le CO_2 est généralement alimenté à la culture sous forme gazeuse entre 5 et 10 % v/v tandis que le milieu de culture contient du NaHCO_3 afin de recréer ce système de tampon présent naturellement dans l'organisme. Toutefois, l'utilisation du tampon pH HEPES (Arora, 2013) est maintenant souvent préférée en raison d'une meilleure stabilité. Il est à noter qu'en bioréacteur, une boucle de contrôle sur le pH permet d'avoir un meilleur contrôle sur ce facteur par ajout de base (e.g. NaOH) et de CO_2 .

1.1.3 Modes de culture

Les modes de culture possibles en bioréacteur sont les mode cuvée, cuvée-alimentée, continu (chemostat) et perfusion. Seuls les modes cuvée alimentée et perfusion en continu sont utilisés pour la production à grande échelle pour la production d'anticorps monoclonaux (Birch, et al., 2006; J. Zhang, 2010). Ces modes se rapportent à la phase liquide du bioréacteur, un apport gazeux étant alimenté en continu chez les cellules de mammifère pour la respiration et le maintien du pH avec le CO_2 .

1.1.3.1. Modes cuvée et cuvée alimentée

Le mode cuvée est le mode le plus simple de culture. Il s'agit d'inoculer un milieu de départ et par la suite ne rien y ajouter, mis à part les contrôles de pH et autres, jusqu'à la fin de la culture. Bien que simple à mettre en place (Rodrigues et al., 2010), ce type de procédé est désavantageux puisque les limitations au niveau des nutriments causent rapidement l'arrêt de la croissance, limitant la production d'anticorps. Le mode cuvée alimentée permet l'alimentation progressive de petits volumes de nutriments sous forme concentrée afin d'éviter les limitations ou limiter l'accumulation de nutriments, puisqu'en général les concentrations trop élevées de nutriments

inhibent la croissance (T. A. Bibila et al., 1995). Le volume initial de culture correspond à entre 40 et 50 % de la capacité maximale du bioréacteur (Wlaschin et al., 2006).

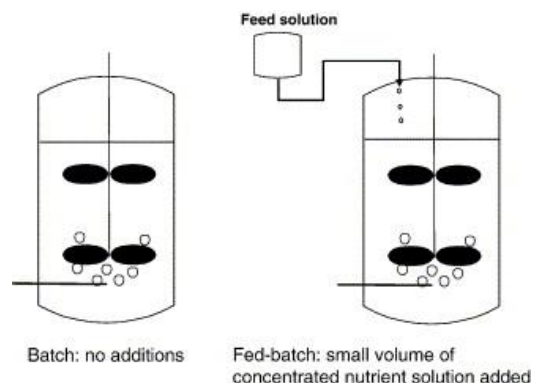


Figure 1.2 Culture en mode cuvée et cuvée alimentée

Tirée de Birch et Racher (2006)

Le mode cuvée alimentée étant relativement simple à mettre en place à grande échelle au niveau des installations et permettant d'augmenter la concentration maximale en cellules viables et la longévité de la culture, il s'agit de loin du mode de culture le plus utilisé en industrie (Birch, et al., 2006). Diverses stratégies d'alimentation peuvent être utilisées, celles-ci seront discutées à la section 1.1.4.

1.1.3.2. Modes continu et perfusion

Le mode de culture continu consiste en l'approvisionnement en continu au bioréacteur de milieu de culture frais, le milieu usé étant retiré en continu, au même débit, i.e. accumulation nulle. Le taux de croissance des cellules est modulé par le taux de dilution, soit le rapport entre le volume de milieu ajouté par unité de temps et le volume présent dans le bioréacteur. Lorsque le taux de dilution est égal au taux de croissance, le régime permanent est atteint (Rodrigues, et al., 2010). Toutefois, ce mode de culture ne permet pas d'obtenir des concentrations élevées en cellules puisque celles-ci sont constamment retirées du bioréacteur, i.e. à un taux correspondant à leur taux de division en régime établi. C'est pourquoi le mode perfusion lui est normalement préféré en industrie. Dans ce cas, les cellules sont retenues dans le bioréacteur par centrifugation, filtration, par des modules à fibres creuses ou par d'autres systèmes de séparation, et seul le milieu usé quitte le bioréacteur (Rodrigues, et al., 2010).

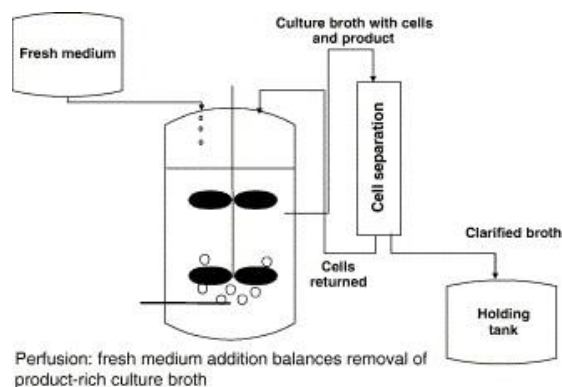


Figure 1.3 Culture en mode perfusion

Tirée de Birch et Racher (2006)

Ce mode permet d'éviter l'accumulation de sous-produits métaboliques (Rodrigues, et al., 2010; J. Zhang, 2010) et donc de prolonger la durée de la culture de quelques jours à entre 15 et 35 jours (Deo et al., 1996) en plus d'atteindre de très hautes concentrations en cellules viables de l'ordre de 10^8 cellules mL^{-1} (Clincke et al., 2013). De plus, contrairement au mode cuvée-alimentée, il alimente en continu du milieu de culture contenant le produit sécrété à l'unité de purification, ce qui optimise son opération. Dans certains cas, puisqu'une première étape de séparation a été effectuée, le milieu peut être directement purifié par chromatographie, permettant d'économiser une étape dans la chaîne de purification (Butler, 2005). Il s'agit toutefois d'un mode de culture dont l'installation et l'opération s'avèrent plus complexe que le mode cuvée alimentée (Butler, 2005; Rodrigues, et al., 2010) et l'apport de milieu en continu a tendance à diluer le produit. Les installations nécessaires sont moins imposantes et moins coûteuses pour le mode perfusion, toutefois le coût global d'installation et de production est semblable pour le mode perfusion et le mode cuvée alimentée, puisque celui-ci a des coûts d'opérations plus bas (Jones et al., 2007). Dans le cas des protéines ou anticorps fragiles, ce mode peut être favorisé à cause d'un temps de résidence moins important dans le bioréacteur alimenté en continu (Wurm, 2004). Le mode de production par perfusion est prometteur, puisqu'il permet de produire à haute productivité volumétrique en continu, intégrant la phase de production à celle de purification. Toutefois, dans la plupart des cas, puisqu'il s'agit d'un procédé plus robuste et mieux connu, le mode cuvée alimentée est encore favorisé.

1.1.4 Stratégies d'alimentation employées pour le mode cuvée alimentée

Tel que mentionné précédemment, le mode cuvée alimentée est le mode le plus couramment utilisé en industrie à cause de la simplicité des installations nécessaires et sa facilité d'opération par rapport au mode perfusion. Toutefois, il est nécessaire de planifier rigoureusement la stratégie d'alimentation à mettre en place. En effet, d'une part, une alimentation en nutriments trop concentrée crée un stress pour les cellules qui peut être dû à l'élévation de l'osmolarité du milieu, les phénomènes d'inhibition par le substrat ou l'augmentation des niveaux de lactate résultant d'un métabolisme non équilibré. D'autre part, une alimentation trop faible cause la consommation rapide des nutriments utiles à la croissance cellulaire, ce qui augmente la mortalité et provoque l'apoptose (Fike, 2009). Différents types de stratégies ont été développées permettant d'alimenter hors-ligne tous les nutriments ou seuls quelques-uns sélectionnés de manière rationnelle, ou encore alimentés selon un processus automatisé. Puisque la stratégie optimale à utiliser peut différer d'une lignée cellulaire à l'autre, idéalement, l'approche utilisée pour développer cette stratégie doit être simple à mettre en œuvre en plus de maximiser le potentiel des cellules.

1.1.4.1. Ajouts de concentrés de milieu

La stratégie la plus simple consiste à alimenter au bioréacteur des solutions de milieu de culture concentrées afin d'empêcher la limitation en nutriment en maintenant les concentrations. Puisque l'ensemble des nutriments essentiels est contenu dans le milieu basal, réalimenter ce milieu devrait normalement permettre de réalimenter tous les nutriments possiblement limitants. Il est généralement possible de concentrer le milieu basal entre 10 et 15 fois sans précipitation (Wlaschin, et al., 2006). Cette méthode a été utilisée avec succès par Bibila et al. (1994), et a permis d'atteindre une concentration en anticorps 7 fois plus élevée qu'en mode cuvée. Dans ce cas, un concentré 10x du milieu basal sans NaCl, KCl et NaHCO₃ a été ajouté à intervalles réguliers à une culture de cellules NS0. Cette approche présente l'avantage d'être très rapide à implémenter, toutefois le résultat est que certains nutriments sont alimentés en excès et d'autres de manière insuffisante (Wlaschin, et al., 2006). C'est pourquoi, dans la plupart des cas, il est avantageux de déterminer la composition du milieu d'alimentation de manière rationnelle en se basant sur les taux de consommation des nutriments et sur leur profil de consommation par rapport au temps.

1.1.4.2. Identification des composants limitants et design rationnel

Afin d'optimiser la stratégie d'alimentation, il est impératif de tenir compte des besoins nutritionnels de la cellule et des surconcentrations et limitations pouvant affecter sa croissance. Wlaschin et Hu (2006) ont proposé une méthode générale pour déterminer la composition à utiliser pour le milieu d'alimentation. Cette méthode repose sur le calcul des coefficients stœchiométriques entre les taux de consommation des différents nutriments essentiels, qui peuvent être obtenus à partir de données de cultures en mode cuvée. Le volume d'alimentation est calculé de manière à combler la consommation en un nutriment dont la concentration est suivie dans le temps, généralement le glucose ou la glutamine. La concentration de ce nutriment dans le milieu d'alimentation étant connue, les concentrations du reste des composés sont déterminées selon les coefficients stœchiométriques de consommation des différents nutriments, permettant de combler les besoins nutritionnels des cellules de manière précise dans le temps.

Cette méthode a déjà été utilisée à de nombreuses reprises, entres autres pour la culture en mode cuvée alimentée des cellules d'hybridomes de souris (Xie et al., 1994b). De manière similaire, le design d'un milieu d'alimentation rationnel a permis d'augmenter la quantité d'interférons gamma produits par une lignée de cellules CHO (Xie et al., 1997) en plus d'améliorer la qualité du produit final. Elle a aussi été reprise par Spens et Haggstrom (2007) pour développer un milieu d'alimentation sans sérum pour des cellules NS0, permettant d'atteindre une concentration en anticorps 11 fois plus élevée qu'en mode cuvée. Dans ce cas, le suivi en ligne des concentrations de glucose et de glutamine a permis d'ajuster les volumes d'alimentations et le calcul des ratios stœchiométriques a permis de déterminer la composition en acides aminés, qui ont été également ajustés dans l'alimentation. Pour les nutriments non facilement mesurables qui sont consommés, tels les vitamines et les lipides, il est assumé qu'ils sont consommés complètement au moment où la culture entre en phase de déclin, ce qui permet d'approximer leur taux de consommation. De manière similaire, Fan et al. (2009) ont généralisé le processus permettant d'appliquer cette approche rationnelle à la fois à une lignée de cellules CHO et de cellules NS0, dans les deux cas prolongeant la durée de la culture et la concentration en cellules viables, et également observant une concentration en anticorps entre 4 et 8 fois plus importante par rapport au mode cuvée. Zhang et al. (2013) ont couplé cette démarche à l'utilisation d'un plan expérimental de type Plackett-Burman et d'un plan central composite comme approche statistique pour déterminer la composition du milieu initial optimal d'une culture de cellules CHO.

Cette méthode comporte toutefois quelques limitations. Tout d'abord, il est impératif d'identifier les nutriments limitants à la culture. La méthode la plus courante est l'utilisation de plans d'expérience fractionnels pour identifier les nutriments ayant un impact sur la croissance et la productivité (Sandadi et al., 2006). La composition des milieux étant très complexe, une large variété de nutriments peuvent limiter la croissance. Par exemple, de Zengotita et al. (2000) ont pu augmenter la concentration finale d'anticorps en alimentant du phosphate, un ion entrant dans la composition des nucléotides et jouant un rôle très important au niveau de la régulation énergétique. De manière générale, à très haute densité cellulaire, il est possible de mesurer une diminution des concentrations de certains ions dans le milieu de culture même si ceux-ci ne sont pas directement consommés (Wlaschin, et al., 2006). Ce phénomène s'applique aux ions tels le magnésium et le potassium dont les concentrations intracellulaires sont plus importantes que les concentrations extracellulaires. De plus, la notion de seuil de concentration au-dessous duquel le nutriment devient limitant peut varier selon le contexte. En effet, le transport transmembranaire des acides aminés est dicté par leur concentration. Pour les acides aminés qui sont en compétition pour le même transporteur, un déséquilibre de concentrations peut causer une diminution du taux de transport de certains acides vers les cellules et donc une limitation même en présence d'une concentration extracellulaire relativement élevée pour certaines acides aminés telles le phénylalanine, la leucine et la glutamine (Wlaschin, et al., 2006) qui compétitionnent pour le même transporteur.

1.1.4.3. Contrôle du métabolisme à l'aide du mode cuvée alimentée

Un objectif du design rationnel des milieux de culture pour l'alimentation est de permettre de maintenir la cellule à son activité métabolique optimale pour une longue durée. Toutefois, cet état initial n'est pas nécessairement le plus efficace. En effet, les cultures de cellules en suspension s'orientent souvent vers un métabolisme peu efficace du point de vue énergétique qui génère des sous-produits métaboliques en grande quantité pouvant être toxiques pour les cellules lorsqu'ils s'accumulent. En effet, pour les hybridomes, le taux de croissance des cellules diminue de moitié en présence de 4 mM d'ammonium ou encore de 55 mM de lactate (Ozturk et al., 1992) alors qu'une concentration de 5.1 mM d'ammonium inhibe la croissance et une concentration de 58 mM de lactate diminue la viabilité cellulaire chez les CHO (Z. Xing, et al., 2008). De plus, une concentration en ammonium trop élevée peut affecter la qualité du produit (Butler, 2005). C'est pourquoi il peut être profitable de diriger le métabolisme des cellules CHO vers un mode de

fonctionnement plus efficace permettant de diminuer la production de lactate et d'ammonium pour pouvoir atteindre de plus hautes densités cellulaires sur une période prolongée. La méthode la plus utilisée est d'habituer progressivement les cellules à des concentrations en glucose très basses, le gain en efficacité étant observable après quelques générations (Wlaschin, et al., 2006). Afin de maintenir la concentration en glucose et en glutamine pour obtenir un état métabolique recherché, le mode cuvée alimenté peut être utilisé (Europa et al., 2000). De nombreux types de commande de procédé peuvent être implémentés afin de maintenir les niveaux en glucose et en glutamine constants, que ce soit en utilisant des mesures en ligne ou non, et en alimentant de manière continue ou intermittente.

Afin de maintenir les concentrations de nutriments spécifiques constantes, tels le glucose ou la glutamine, la méthode la plus simple est d'établir une boucle de contrôle agissant sur le débit alimenté en fonction des concentrations de glucose et/ou de glutamine présentes dans le milieu, puisque celles-ci peuvent être obtenues en ligne assez aisément. Une plus haute densité cellulaire, de 3×10^6 cellules par mL à 1×10^7 cellules par mL, sur une plus longue période, de 8 à 14 jours, a été observée chez des cellules hybridomes (L. Li, et al., 2005) en maintenant les concentrations de cette manière à 0,5 mM et 0,3 mM pour le glucose et la glutamine respectivement. Une amélioration de l'efficacité du métabolisme où une consommation nette de lactate a été observée chez les cellules BHK avec des points de consignes à 0,3 mM pour le glucose et à 0,2 mM pour la glutamine (Helder J. Cruz et al., 2000), et une augmentation de production par 10 a été observée chez les cellules HEK-293 maintenue à 0,1 mM de glutamine de cette manière (Lee et al., 2003). Ce type de résultat a été également observé chez les cellules humaines PER.C6 (Maranga et al., 2006) et chez les cellules CHO (Chee Fung Wong et al., 2005a), avec une concentration en glutamine maintenue à 0,1 mM et un ratio de consommation glucose/glutamine maintenu à 5:1. Il est aussi possible d'opérer ce type de culture en se basant sur la consommation en oxygène à l'intérieur du bioréacteur (Zhou et al., 1997), en tenant pour acquis que le ratio entre la consommation d'oxygène et celle de glucose soit connu et demeure constant. Il existe plusieurs autres méthodes permettant d'orienter le métabolisme de manière désirée permettant de maximiser la productivité de la culture. L'une d'entre elles consiste à tirer profit du fait que la réaction produisant le lactate chez les cellules de mammifères est réversible et dépendante, entre autres, du pH. Il est donc possible, en se basant sur cette valeur en ligne, de créer une boucle de contrôle qui permet d'alterner entre un métabolisme où le glucose est alimenté et consommé et le

lactate est produit, acidifiant le milieu, et un métabolisme où le lactate produit précédemment est consommé, faisant augmenter le pH du milieu (Gagnon et al., 2011). Ce type de boucle de contrôle permet de limiter l'accumulation de lactate et d'atteindre des concentrations en cellules viables très élevées de près de 50 millions de cellules par mL. Une autre méthode est de diviser la culture en deux phases distinctes, l'une où la biomasse est produite et une autre où l'anticorps est produit. Cette division est généralement obtenue par une diminution de la température d'opération qui ralentit le métabolisme (Fox et al., 2004; Yoon et al., 2003), toutefois elle peut être obtenue au moyen d'une stratégie de cuvée alimentée conçue en ce sens. Altamirano et al. (2004) ont réussi à prolonger la durée d'une culture de cellules CHO et à maintenir la viabilité élevée en alimentant une solution contenant du galactose au lieu du glucose contenu dans le milieu initial. Le galactose est métabolisé plus lentement et permet de diminuer l'accumulation de lactate en favorisant sa consommation (C. Altamirano et al., 2006). La substitution cause une diminution importante de la croissance cellulaire. Toutefois, selon le même principe que l'abaissement de température, si ce changement est effectué lorsque la concentration en biomasse atteint un plateau, il est possible de prolonger la phase de production et donc la concentration finale en produit d'intérêt.

1.2 Métabolisme des cellules de mammifères

La section précédente a présenté les différentes stratégies qui peuvent être employées afin de cultiver de manière optimale les cellules mammifères, plus spécifiquement les cellules CHO. Toutefois, la plupart des stratégies mentionnées considèrent la cellule comme une boîte noire avec des entrées et des sorties. Or, la transformation des entrées en sorties dépend du métabolisme s'opérant à l'intérieur de la cellule, et l'étude des phénomènes liant les entrées aux sorties a le potentiel d'optimiser les procédés de fabrication d'anticorps monoclonaux, entre autres. Les cellules CHO, et les cellules de mammifère en suspension en général, ont certains traits métaboliques caractéristiques qui les différencient des autres cellules de mammifère *in vivo*. Par exemple, elles ont un taux de croissance très élevé, une forte activité glycolytique et un ratio de production de mole de lactate par mole de glucose très élevé. L'étude de leur métabolisme permet de mieux les orienter vers un métabolisme plus efficace pour atteindre une meilleure productivité.

1.2.1 Survol de la physiologie des cellules CHO

Les réactions biochimiques desquelles découle le métabolisme cellulaire ne dépendent pas uniquement des réactifs, substrats ou nutriments en place. En effet, les cellules de mammifère, comme toutes cellules eucaryotes, sont hautement structurées et compartimentées. La compartimentation permet de créer différentes zones dans la cellule où différents ensembles de réactions peuvent s'y produire dans des conditions particulières, tandis que les transporteurs permettent de réguler le passage des métabolites inter-compartiments et avec l'environnement.

1.2.1.1. Organisation et compartimentation de la cellule

Contrairement aux bactéries et aux cellules de plantes, les cellules de mammifère ont une seule bicouche lipidique comme membrane plasmique (Berg et al., 2002), l'absence de paroi cellulaire pouvant expliquer, avec leur taille, pourquoi ces cellules sont sensibles aux forces de cisaillement (Ryu et al., 1994). La Figure 1.4 montre l'organisation à l'intérieur de la cellule.

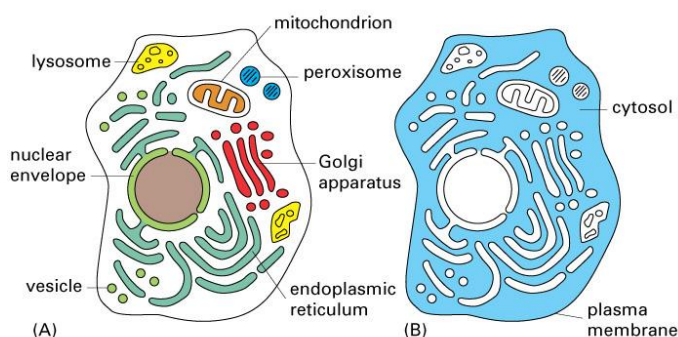


Figure 1-24 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

Figure 1.4 Compartimentation de la cellule

Tirée de Alberts et al. (2004)

Le cytosol est le liquide occupant environ la moitié du volume de la cellule dans lequel se déroulent de nombreuses réactions métaboliques intermédiaires, y compris la glycolyse (Berg, et al., 2002). Dans ce liquide baignent les différentes organelles de la cellule. La synthèse des protéines débute dans le noyau. Celui-ci contient le génome principal, la mitochondrie en

hébergeant une partie, et est le lieu où s'effectuent la synthèse de l'ADN et la transcription de l'ARN à partir des gènes, les transcriptomes étant utilisés par la suite par les ribosomes pour synthétiser les séquences peptidiques des protéines. Connecté au noyau, le réticulum endoplasmique est un labyrinthe de membranes dont les parois sont tapissées de ribosomes. Les lipides et de nombreuses protéines transmembranaires et sécrétés, y compris les anticorps, y sont synthétisés, repliés et assemblés dans le cas des protéines (B. Alberts et al., 2002). Il est à noter que les étapes limitantes de la production d'anticorps monoclonaux semblent être l'assemblage et le repliement des anticorps et non pas la transcription ou de la synthèse des peptides (Dinnis et al., 2005). Finalement, à la suite du réticulum endoplasmique, les protéines sont acheminées vers l'appareil de Golgi (B. Alberts, et al., 2002), d'où elles sont transportées au moyen de différents vésicules vers le cytosol ou encore sécrétées à l'extérieur de la membrane plasmique dans le milieu de culture.

Le transport entre les compartiments est assuré par différentes protéines transmembranaires appelées transporteurs. Elles ont un rôle dans le transport des nutriments vers le cytosol et les mitochondries et dans la régulation du métabolisme. Pour le glucose, chez les cellules non épithéliales telles les CHO, le transport se fait de manière majoritairement facilitée, c'est-à-dire sans dépense énergétique associée. Il existe douze transporteurs du glucose identifiés chez les mammifères, GLUT 1 à 12. Les transporteurs GLUT1 et GLUT4 sont les mieux étudiés, ayant une grande affinité pour le glucose (Macheda et al., 2005). Leur expression peut être induite lorsque les niveaux énergétiques de la cellule sont bas (Mulukutla et al., 2010). La surexpression des transporteurs GLUT1 et GLUT3 est associée à un haut flux glycolytique (Claudia Altamirano et al., 2013), tel ce qui est observé chez les cellules tumorales et les cellules CHO.

1.2.1.2 Besoins nutritionnels de la cellule

Afin d'assurer leur maintien et leur prolifération, les besoins nutritionnels des cellules doivent être comblés. Celles-ci ont besoin d'une source de carbone à la fois comme source d'énergie, mais aussi pour servir de précurseur à la biosynthèse des différentes macromolécules. Habituellement, ce rôle est en grande partie assumé par un monosaccharide tel le glucose. Il est aussi indispensable d'avoir une source d'azote, ce rôle étant habituellement rempli par les acides aminés contenus dans le milieu. Il existe 20 acides aminés de base, et neuf d'entre elles ne peuvent pas être synthétisées par les cellules de mammifère à partir d'autres acides aminés. Généralement, les

milieux de culture contiennent tous ces acides aminés. Le Tableau 1.1 représente la composition typique d'une cellule de mammifère (Prescher et al., 2005), chacun des composants devant être synthétisé à partir des précurseurs contenus dans le milieu afin d'assurer la croissance et la viabilité cellulaire.

Tableau 1.1: Composition typique d'une cellule de mammifère

Composé	Contribution (masse sèche)
Protéines	60 %
Lipides	16 %
Glycans	6 %
Acides nucléiques	5 %
Ions inorganiques	3 %
Autres	10 %

En plus des éléments présents en grandes quantités, les cellules ont généralement besoin d'éléments en concentration trace tels le cuivre et le zinc ainsi que certaines vitamines pour croître (Arora, 2013), des éléments tous présents dans les milieux de culture pour cellules de mammifère.

1.2.2 Voies du métabolisme central du carbone

Le métabolisme central du carbone décrit les voies métaboliques qui se concentrent sur la dégradation (catabolisme) des différentes sources de carbone de la cellule, en particulier les monosaccharides tels le glucose et les acides aminés. L'ensemble de ces voies, en plus de fournir à la cellule les composantes de bases des différentes macromolécules biosynthétisées, permettent d'alimenter le métabolisme en énergie sous forme entre autres d'ATP, ce qui explique son importance par rapport à l'ensemble du métabolisme. La Figure 1.5 décrit de manière simplifiée les principales voies du métabolisme central du carbone.

différents nucléotides et est en compétition avec la glycolyse. De nombreux acides aminés, particulièrement la glutamine, peuvent être métabolisés en intermédiaires du cycle TCA, alors que l'Acétyl-CoA permet la dégradation des acides gras en intermédiaire du cycle TCA ainsi que la synthèse des acides gras à partir des mêmes intermédiaires.

1.2.2.1. Glycolyse

La glycolyse est la dégradation en dix étapes du glucose en pyruvate. Tout d'abord, le glucose est transformé en glucose-6-phosphate (G6P), en fructose-6-phosphate (F6P), puis en fructose-1,6-biphosphate, respectivement par les enzymes hexokinase, phosphoglucose isomérase et phosphofructokinase. L'intermédiaire métabolique est ensuite scindé en deux molécules à trois carbones chacune par l'aldolase, le glycéraldéhyde-3-phosphate et le dihydroxyacétone phosphate, cette dernière elle-même convertit en glycéraldéhyde-3-phosphate par la triose phosphate isomérase. Chacune de ces molécules à trois carbones est, en trois étapes, elle-même convertit en phosphoenolpyruvate. Ce dernier est finalement convertit de manière irréversible en pyruvate par la pyruvate kinase (Berg, et al., 2002). La Figure 1.6 résume le processus de la glycolyse.

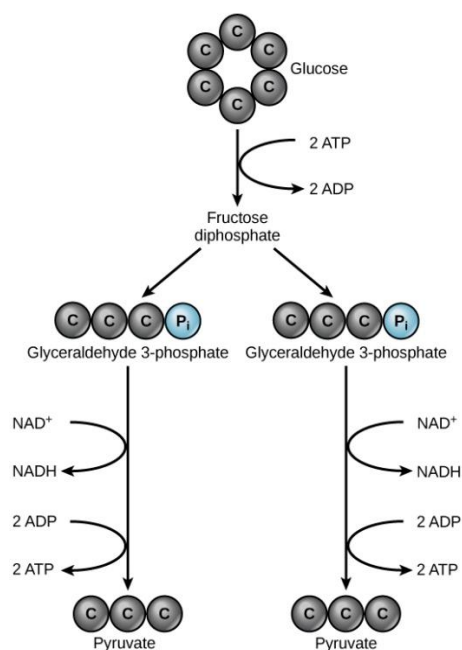
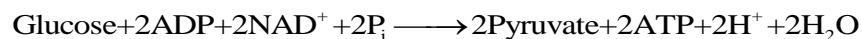


Figure 1.6 Résumé de la glycolyse

Tiré de Mahr (2013)

La réaction nette résultant de la glycolyse est le suivant:



Le pyruvate généré peut par la suite être utilisé principalement de deux manières différentes: soit transporté vers les mitochondries, où il pourra être dégradé dans le cycle des acides tricarboxyliques, ou soit transformé en lactate par un processus anaérobie. Chez les cellules CHO, tout comme chez toutes les lignées continues utilisées pour la production de protéines recombinantes, un métabolisme particulier est observé, caractérisé par un très haut flux de glycolyse et une très forte conversion en lactate, jusqu'à 90 % (Mulukutla, et al., 2010). Ce métabolisme particulier, observé tout d'abord chez les cellules tumorales, a été nommé effet Warburg (Warburg, 1956). Même si les cellules sont en présence d'oxygène, la glycolyse mène en grande partie à la production de lactate, bien que cette voie métabolique soit moins efficace énergétiquement. Ce type de métabolisme, caractérisé par un très haut débit de glycolyse, permet de fabriquer un grand nombre de précurseurs pour les macromolécules requises à la prolifération cellulaire (Vander Heiden et al., 2009), ce qui pourrait expliquer sa présence chez les lignées cellulaires présentant une forte croissance. Ce métabolisme est caractérisé par la surexpression de certaines enzymes de la glycolyse, dont l'hexokinase II, la phosphofructokinase et les transporteurs du glucose (Claudia Altamirano, et al., 2013; Mulukutla, et al., 2010). Certaines approches ont été tentées afin de favoriser le flux de glucose vers le cycle de Krebs, tel une diminution de l'expression de l'enzyme lactate déshydrogénase qui transforme le pyruvate en acide lactique (S. H. Kim et al., 2007), ou l'expression de l'enzyme pyruvate carboxylase cytosolique qui permet une entrée accrue de pyruvate dans la mitochondrie (Irani et al., 1999).

1.2.2.2. Cycle des acides tricarboxyliques

Advenant le cas où le pyruvate n'est pas transformé en acide lactique par l'enzyme lactate déshydrogénase et excrété hors de la cellule, la seconde étape est la transformation du carbone issu du glucose en CO₂ dans les mitochondries par le cycle des acides tricarboxyliques. Les mitochondries sont des organelles situées dans le cytosol servant à produire de l'énergie en présence d'oxygène. La première étape est le transport du pyruvate dans la mitochondrie, puis sa dégradation irréversible en acétylcoenzyme A, une molécule à deux carbones. Cette molécule se lie avec une molécule à 4 carbones, l'oxaloacétate, pour en former une à 6 carbones, le citrate.

Cette molécule est par la suite dégradée par étapes en une molécule à 4 carbones qui est l'oxaloacétate.

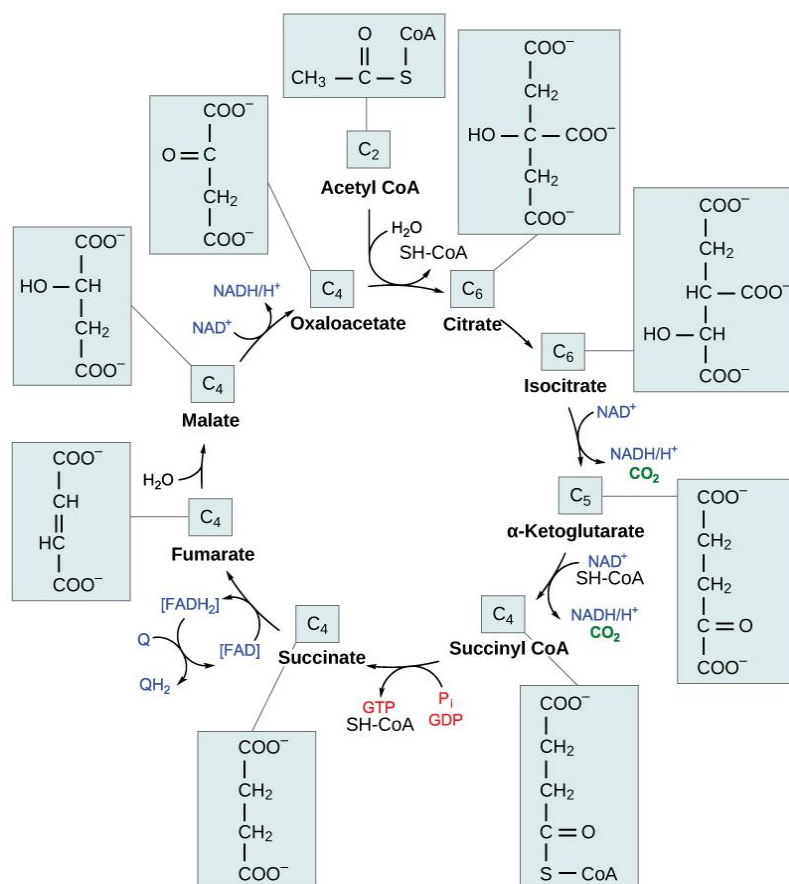
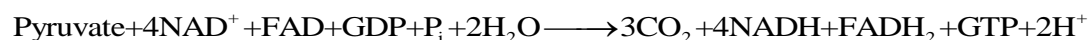


Figure 1.7 Cycle des acides tricarboxyliques

Tiré de Bear et Rintoul (2014a)

Puisque le produit de la chaîne de réaction, l'oxaloacétate, est aussi un des réactifs initiaux, il s'agit d'un cycle. Le résultat net est le suivant (Berg, et al., 2002):



Le cycle oxyde totalement le pyruvate en CO₂, permettant au passage la réduction de nombreuses navettes énergétiques. En plus de fournir de l'énergie, le cycle de Krebs permet de produire des précurseurs pour la synthèse de biomasse et d'anticorps (Berg, et al., 2002). Il existe donc d'autres voies métaboliques pour empêcher la déplétion des intermédiaires du cycle TCA en court-circuitant la voie normale. La pyruvate carboxylase permet de transformer le pyruvate en oxaloacétate par carboxylation avec une molécule de CO₂. La malate déshydrogénase permet,

elle, de transformer le malate de manière réversible en pyruvate. Alors qu'il est possible de décarboxyler le malate à l'intérieur de la mitochondrie par réduction du NAD^+ , une des isoformes de cette enzyme (EM II) permet cette réaction dans le cytoplasme par réduction du NADP^+ (Claudia Altamirano, et al., 2013). Puisque la membrane de la mitochondrie possède des transporteurs pour le malate (Berg, et al., 2002; Cherlet, et al., 1999), il est donc possible de faire le lien entre les intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques et le cytosol sans passer par les voies habituelles, l'enzyme pyruvate déshydrogénase transformant le pyruvate en acétyl-coA étant potentiellement un goulot d'étranglement du métabolisme des cellules CHO (Niu et al., 2013).

Tel que mentionné précédemment, les cellules CHO sont généralement caractérisées par un haut taux de glycolyse et une production lactique élevée, ce qui fait en sorte que le flux de carbone se dirigeant vers le cycle des acides tricarboxylique est plutôt faible en phase exponentielle de croissance. Toutefois, lorsque les cellules ne sont plus en phase de croissance, le flux de glycolyse diminue, tandis que le flux de carbone allant au cycle TCA reste inchangé en valeur absolue (Ahn, et al., 2011), celui-ci étant donc proportionnellement beaucoup plus élevé (Sengupta, et al., 2011). Alors qu'un faible flux de cycle TCA et une production de lactate importante sont généralement associés à un taux de croissance élevé, un flux du cycle TCA proportionnellement élevé est associé à une baisse du taux de croissance des cellules, mais à une augmentation du taux de production spécifique en anticorps (Chong et al., 2012; Dean et al., 2013; Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014; Templeton et al., 2013). Puisqu'il peut être intéressant de découpler les phases de croissance et de production pour atteindre des concentrations maximales en anticorps, la manipulation du métabolisme à l'embranchement entre le cycle TCA et la production de lactate représente donc une avenue intéressante.

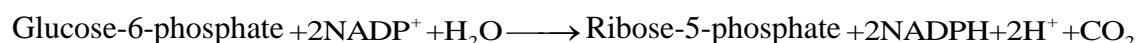
1.2.2.3. Métabolisme des acides aminés

Le glucose n'est pas le seul contributeur au cycle de Krebs, puisque les acides aminés contribuent à la moitié de l'énergie produite par ce cycle (Wlaschin, et al., 2006), en plus de contribuer au renouvellement de ses intermédiaires. En effet, 30 % du citrate ainsi que 50 % du malate et du succinate seraient issus de la glutamine et de l'asparagine (Dean, et al., 2013). Les points d'entrées pour les acides aminés sont nombreux (voir Figure 1.5). Niu et al. (2013) suggèrent que la contribution des acides aminés autres que la glutamine, la glutamate, et l'alanine, à la

production d'énergie étant de moins de 5 % est donc négligeable. La principale voie demeure donc la conversion de la glutamine en glutamate puis sa conversion subséquente en alphacétoglutarate, un intermédiaire du cycle de Krebs. Cette réaction forme une molécule d'ammonium à chaque étape, contribuant à l'acidification du milieu de culture et l'augmentation de son osmolarité (H. J. Cruz et al., 2000). Il est aussi possible, par l'enzyme alanine aminotransférase, de convertir de manière réversible une molécule d'alanine et d'alphacétoglutarate en pyruvate et en glutamate. De manière similaire, il est possible de convertir de manière réversible une molécule d'aspartate et d'alphacétoglutarate en oxaloacétate et en glutamate (Berg, et al., 2002). Le glutamate alors produit peut être reconverti en alphacétoglutarate par la glutamate déshydrogénase, comme c'est le cas pour la dégradation de la glutamine.

1.2.2.4. Voie des pentoses phosphates

Un embranchement de la glycolyse se situe à son point d'entrée au niveau du glucose-6-phosphate. En plus de pouvoir être converti en fructose-6-phosphate vers la glycolyse et en glycogène, celui-ci peut être oxydé en une molécule à 5 carbones par la voie des pentoses phosphates. La réaction globale est la suivante (Berg, et al., 2002):



Les molécules à 5 carbones formées peuvent alors servir de précurseurs à la formation d'ADN, d'ARN ou de nucléotides. Elles peuvent aussi être réacheminées vers la glycolyse via l'enzyme transketolase. Le NADPH sert de donneur d'électron pour de nombreuses réactions de biosynthèse en plus de protéger les cellules contre le stress oxydatif. La voie des pentoses phosphates a été identifiée comme étant beaucoup plus active comparativement à la glycolyse lorsque la cellule n'est plus en croissance (Ahn, et al., 2011; Sengupta, et al., 2011) et étant liée à une productivité spécifique d'anticorps plus élevée (Templeton, et al., 2013), de manière similaire au cycle de Krebs.

1.2.3 Métabolisme énergétique

Une des tâches importantes du métabolisme central du carbone est de fournir l'énergie aux cellules pour qu'elles puissent croître, assurer leur maintenance et produire, entre autres, la protéine d'intérêt. Cette énergie est emmagasinée sous forme de navettes énergétiques, qui

prennent une forme oxydée ou réduite selon qu'elles soient prêtes à fournir de l'énergie ou non. Les réactions cataboliques permettent de manière générale de convertir l'ADP en ATP, qui est ensuite utilisé par la cellule pour son potentiel énergétique. Un ratio ATP/ADP trop bas peut induire l'apoptose (Izyumov et al., 2004). L'ATP est utilisé dans de nombreuses réactions, incluant les réactions de synthèse de biomasse et d'anticorps, ainsi que pour le transport actif des nutriments et des ions. Le NADH est produit à partir de NAD^+ généralement par dégradation du glucose et des acides aminés, principalement dans le cycle des acides tricarboxyliques. Le NADH peut être reconverti par production de lactate ou bien en échange d'ATP par respiration cellulaire.

1.2.3.1. Phosphorylation oxydative et respiration cellulaire

La glycolyse permet la production nette de deux molécules de NADH dans le cytosol, alors que le cycle des acides tricarboxyliques permet la production de 8 molécules de NADH et 2 molécules de FADH_2 par molécules de glucose dans la mitochondrie. Afin d'utiliser leur potentiel énergétique, ces molécules doivent être converties en ATP. La formation de lactate par la lactate déshydrogénase permet la régénération d'une mole de NADH en NAD^+ par mole de pyruvate, sans toutefois produire d'ATP. La phosphorylation oxydative du NADH et du FADH_2 permet de régénérer ces deux molécules en échange d'ATP. Cette étape du métabolisme se déroule dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Une série de réactions biochimiques permettent le transfert des électrons libres du NADH vers l'oxygène, qui agit comme accepteur d'électrons. Cette succession d'étapes, appelée la chaîne de transport des électrons, permet le passage d'ions H^+ de la mitochondrie vers l'espace intermembranaire, ce qui crée un gradient de concentration et un potentiel électrique à la membrane. Le retour des ions vers l'intérieur de la mitochondrie se fait généralement au moyen de la pompe ATP synthase, qui synthétise de l'ATP à partir d'ADP en échange du passage des ions (Lodish et al., 2000). Il est toutefois possible que les protons retournent à la mitochondrie sans l'aide de la pompe ATP synthase et donc sans synthèse d'ATP, un phénomène appelé la fuite des protons (*proton leak*) (Jastroch et al., 2010). La Figure 1.8 illustre le processus.

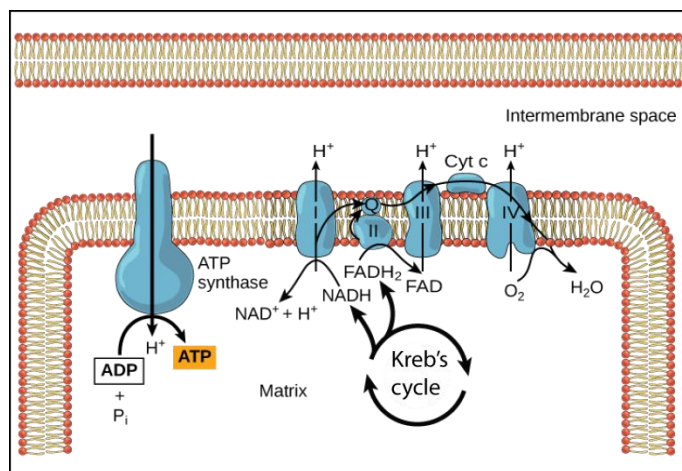


Figure 1.8 Phosphorylation oxydative

Tirée de Bear et Rintoul (2014b)

La phosphorylation oxydative du NADH utilise le NADH mitochondrial. Pour ce qui est du NADH cytosolique, produit lors de la glycolyse, celui-ci doit être acheminé par transport actif vers la mitochondrie, au coût d'une mole d'ATP par mole de NADH, en utilisant la navette glycérol-3-phosphate ou encore la navette malate-aspartate (Berg, et al., 2002). Puisque la glycolyse est limitée par la vitesse à laquelle le NADH est régénéré (Mulukutla, et al., 2010) et que la vitesse de transport du NADH vers la mitochondrie semble être l'étape limitante chez les cellules CHO (Niu, et al., 2013), la plupart du NADH produit par la glycolyse est donc régénérée par la production de lactate pour répondre au haut flux glycolytique (Claudia Altamirano, et al., 2013; Hinkle, 2005). L'amélioration du transport du NADH vers la mitochondrie semble donc être une piste prometteuse pour améliorer l'efficacité énergétique de la cellule.

1.2.3.2. Rendements énergétiques des différentes voies

La production des coenzymes énergétiques lors du cycle de Krebs et de la glycolyse permet de transformer ceux-ci en ATP lors de la phosphorylation oxydative. Le Tableau 1.2 indique le rendement en ATP normalement accepté pour chaque molécule (B. Alberts, et al., 2002).

Tableau 1.2: Rendement en ATP des coenzymes réduites par les réactions cataboliques

Molécule	Rendement en ATP par molécule
NADH (Mitochondrial)	2.5
NADH (Cytosolique)	1.5
FADH ₂	1.5
GTP	1

À partir de ces rendements, un rendement global en ATP pour chacune des voies métaboliques peut être obtenu. Il est à noter que ces rendements dépendent des rendements en ATP des différents nucléotides et que ceux-ci ne sont pas exacts. Alors que les quantités d'ATP et de NADH produites par chaque voie sont bien connues à cause de la stœchiométrie fixe, la stœchiométrie de la quantité d'ATP fournie par pompage des protons n'est ni un nombre entier ni fixe (Berg, et al., 2002).

Tableau 1.3: Rendement énergétique des différentes voies métaboliques

Voie métabolique	Substrat	Rendement en ATP	Source
Production lactique	Glucose	2	(Berg, et al., 2002)
Respiration cellulaire	Glucose	30	(Berg, et al., 2002)
Glutamate	Glutamine	27	(Michael W Glacken, 1988)
Alanine transaminase	Glutamine	9	(Michael W Glacken, 1988)
Aspartate transaminase	Glutamine	9	(Michael W Glacken, 1988)

Alors que la glycolyse, avec production de lactate, permet la création nette de 2 ATP, la glycolyse suivie du cycle de Krebs permet d'en créer environ 15 fois plus (B. Alberts, et al., 2002). Des valeurs de 36 ou 38 ATP sont souvent rapportées comme maximum théorique par respiration cellulaire, mais celles-ci utilisent un ratio de 3 ATP pour 1 NADH et de 2 ATP pour 1 FADH₂. Hinkle (2005) a passé en revue des différentes valeurs rapportées dans la littérature et suggère d'adopter les valeurs présentées au Tableau 1.2. Dans un cas comme dans l'autre, le cycle TCA est une voie métabolique beaucoup plus efficace énergétiquement que la production de lactate. Dans le cas de la glutamine, une fois sous forme de glutamate, sa dégradation en alpha-cétoglutarate est plus efficace énergétiquement que sa transamination en oxaloacétate ou en

pyruvate. Il est à noter que les rendements en ATP à partir de la glutamine, tel que proposés par Glacken (1988), ont été obtenus en assumant un rendement de 3 moles d'ATP par mole de NADH.

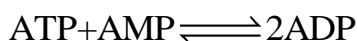
1.2.4 Régulation du métabolisme

Afin de pouvoir réagir aux perturbations extérieures, le métabolisme est régulé à différents niveaux. Le premier niveau consiste en la structure même des réseaux métaboliques, qui partagent souvent les mêmes intermédiaires et se compétitionnent entre eux. Pour améliorer cette régulation, les différents intermédiaires peuvent affecter l'activité des enzymes au moyen de régulations allostériques, par inhibition rétroactive et par l'activation par anticipation de certaines enzymes. Finalement, au niveau transcriptionnel, les différentes protéines de signalisation permettent une régulation additionnelle (Mulukutla, et al., 2010).

Les trois principales enzymes régulant la glycolyse sont la phosphofructokinase, l'hexokinase et la pyruvate kinase. La phosphofructokinase est inhibée à 50 % de son activité maximale par 0,25 mM de citrate (Berg, et al., 2002; Y. Li et al., 1999; Mulukutla, et al., 2010), un intermédiaire du cycle TCA, ainsi que par le lactate, avec une perte de près de 50% de son activité à 5 mM (Costa Leite et al., 2007). En plus de PFK1 qui synthétise le fructose-1,6-biphosphate, l'enzyme PFK2 est en compétition avec celle-ci pour synthétiser réversiblement le fructose-2,6-biphosphate. Cet intermédiaire ne contribue à aucune voie métabolique. Toutefois, son accumulation, due à des concentrations élevées en fructose-6-phosphate, active allostériquement PFK1 (Berg, et al., 2002). De plus, PFK2 est inhibée par le phosphoenolpyruvate (Berg, et al., 2002; Mulukutla, et al., 2010), alors que cet intermédiaire peut aussi inhiber la phosphoglucose isomérase avec un K_i de 0,26 mM (affinité) (Ogawa et al., 2007), agissant ainsi comme inhibiteur par rétroaction. L'hexokinase, peut être inhibée par son produit, le glucose-6-phosphate (Berg, et al., 2002), avec une perte de 20 % de son activité à 0,1 mM (Marín-Hernández et al., 2006). La pyruvate kinase est activée allostériquement par le fructose-1,6-biphosphate (Mulukutla, et al., 2010), avec une augmentation de 20 % de son activité à 2,5 mM (Akhtar et al., 2009). Le réseau de régulation de la glycolyse permet donc d'ajuster le flux glycolytique aux demandes de la cellule.

À ce niveau de régulation viennent s'ajouter les régulations via les nucléotides et coenzymes énergétiques. L'ATP est un co-substrat intervenant dès les premières étapes de la glycolyse alors

que par la suite l'ADP devient le co-substrat puisque l'ATP y est produit. De plus, le flux de phosphorylation oxydative dépend de la demande en ATP, étant plus élevée à des concentrations d'ADP élevées (Berg, et al., 2002), de même que le flux TCA dépend des ratio ATP/ADP et NAD^+/NADH . De manière similaire, le flux de la voie des pentoses phosphates est régulé par le ratio $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ (Kruger et al., 2003), donc selon la demande en NADPH. Toutefois, le principal régulateur de la glycolyse est l'AMP. Celui-ci est en équilibre avec la concentration d'ADP selon la réaction suivante, rendue possible grâce à l'adénylate kinase:



La concentration en AMP augmente rapidement lorsque la concentration en ADP devient élevée. Puisque l'ATP utilisé par la cellule comme source d'énergie est transformé en ADP, la concentration en ADP devient élevée lorsque la production d'énergie ne suffit plus à la demande énergétique. L'AMP active alors allostériquement plusieurs enzymes de la glycolyse (l'hexokinase, la phosphofructokinase et la lactate déshydrogénase), en plus de favoriser l'expression des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4 et de diminuer la synthèse des acides gras (Berg, et al., 2002; Jing et al., 2007; Mulukutla, et al., 2010). L'AMP sert donc de signal pour passer d'un mode de production d'énergie oxydatif à un mode plus axé sur la glycolyse. Le schéma à la Figure 1.9 résume la régulation qui a lieu dans la glycolyse.

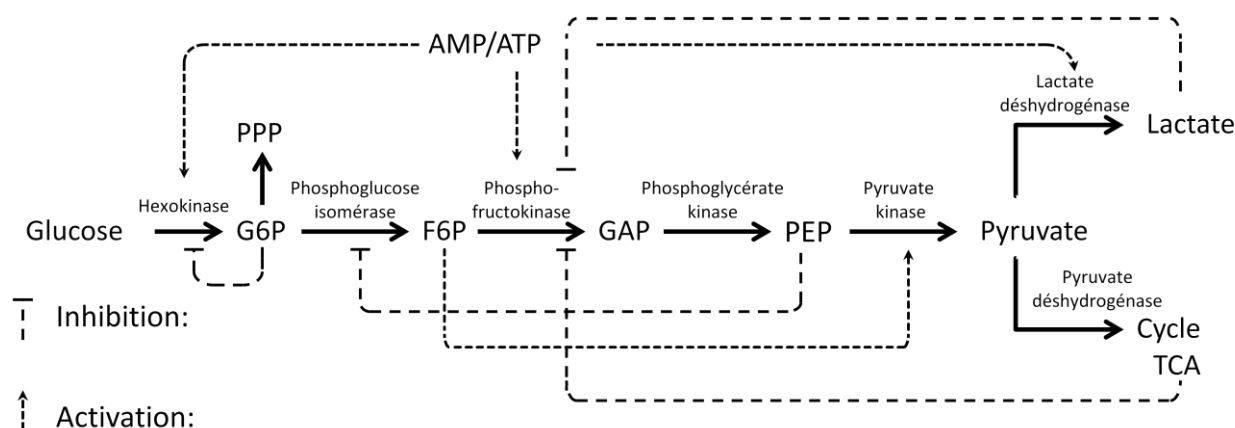


Figure 1.9 Régulation de la glycolyse

En résumé, la glycolyse est inhibée par ses produits, le lactate et le citrate et ceux issus du cycle des acides tricarboxyliques, et est activée lorsque la cellule est en demande d'énergie, un état signalé par l'augmentation de la concentration d'AMP.

1.3 Approches de modélisation du métabolisme

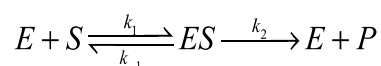
Le développement de nouvelles formulations pour les milieux de culture de cellules de mammifère ainsi que pour le développement de stratégies d'alimentation sont des processus s'appuyant historiquement sur la collecte de données expérimentales issues de plans expérimentaux intuitifs. Or, l'expérimentation nécessite un investissement important en temps et en argent. La possibilité de d'appuyer l'expérimentation en laboratoire par l'expérimentation *in silico* laisse envisager la possibilité d'obtenir une quantité importante de résultats prospectifs rapidement et à peu de frais (Sidoli et al., 2004). Toutefois, cela nécessite le développement de modèles prédictifs qui soient à la fois précis et robustes.

1.3.1 Approches de modélisation des vitesses réactionnelles des flux métaboliques

Les réactions biochimiques peuvent tout d'abord être étudiées individuellement. Les mécanismes précis décrivant les réactions enzymatiques étant généralement connus, il est possible de modéliser les vitesses réactionnelles enzymatiques *in vitro* de manière théorique. La croissance cellulaire étant un processus de nature beaucoup plus complexe, sa modélisation est du même coup beaucoup plus empirique.

1.3.1.1. Cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique est généralement référée comme étant une cinétique de saturation. Puisque les enzymes (E) ont un nombre fini de sites actifs pouvant lier le substrat, lorsque tous ces sites sont occupés par le substrat, la vitesse enzymatique est saturée. Ce phénomène s'observe à l'échelle macroscopique. En considérant le cas d'une réaction enzymatique simple où le substrat S forme un complexe ES de manière réversible puis est transformé en produit P selon la réaction suivante :



la vitesse enzymatique v peut être exprimée selon l'équation de Michaelis-Menten (Shuler et al., 1992) :

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]}, \text{ où } K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \text{ et } V_{\max} = k_2[E_0]$$

Cette équation prends pour acquis que la réaction directe de formation du complexe ES , sa réaction inverse correspondante, ainsi que la réaction de formation du produit sont toutes des réactions de premier ordre avec respectivement k_1 , k_{-1} et k_2 comme constantes cinétiques. La constante K_m est appelée la constante de demi-saturation, alors que $[E_0]$ correspond à la quantité d'enzyme initiale. Cette formulation a pour hypothèse que le complexe enzyme-substrat est constant et donc que la réaction globale est en régime permanent.

Dans certains cas, la liaison d'un substrat à un site actif de l'enzyme facilite la liaison subséquente d'autres substrats. Il est alors question de liaison allostérique. Ce type de liaison peut être modélisé par l'équation de Hill.

$$V = \frac{V_{\max} [S]^n}{K_m^n + [S]^n}$$

Un coefficient n supérieur à 1 indique une coopération positive. Contrairement à la cinétique de saturation observée avec l'équation de Michaelis-Menten, l'équation de Hill prend une allure sigmoïdale lorsque l'on trace la vitesse réactionnelle en fonction de la concentration en substrat.

1.3.1.2. Activation et inhibition des voies métaboliques

Le taux de réaction enzymatique n'est pas uniquement fonction de la concentration de ses substrats et de ses co-substrats. En effet, tel que vu à la section 1.2.4 couvrant la régulation du métabolisme, la vitesse de certaines enzymes peut réguler le métabolisme par des mécanismes d'inhibition par rétroaction (ou inhibition par le produit) ou encore par des mécanisme d'activation par anticipation. Les cinétiques de ces mécanismes ont été déterminées puis confirmées *in vivo*, et le Tableau 1.4 présente les équations associées aux types d'inhibition (Shuler, et al., 1992) et d'activation (Segel, 1993) les plus courantes, où S représente un substrat, I un inhibiteur, A un activateur et K_I et K_A sont respectivement des constantes d'inhibition et d'activation.

Tableau 1.4: Équations d'inhibition et d'activation

Phénomène	Équation
Inhibition compétitive	$V = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m (1 + [I] / K_I)}$
Inhibition non compétitive	$V = \frac{V_{\max} / (1 + [I] / K_I) [S]}{[S] + K_m}$
Inhibition incompétitive	$V = \frac{V_{\max} / (1 + [I] / K_I) [S]}{[S] + K_m / (1 + [I] / K_I)}$
Activation non essentielle	$V = \frac{V_{\max} [S] (1 + \beta [A] / \alpha K_A)}{K_S (1 + [A] / K_A) + [S] (1 + [A] / \alpha K_A)}$

Il est question d'inhibition compétitive lorsque l'inhibiteur est similaire au substrat et compétitionne avec celui-ci pour le site actif de l'enzyme. Une inhibition non compétitive a lieu lorsque l'inhibiteur se lie à un site différent du site actif de l'enzyme pour réduire l'affinité de l'enzyme envers le substrat tandis qu'un inhibiteur incompétitive ne se lie pas à l'enzyme, mais interagit avec le complexe enzyme-substrat et compétitionne plutôt avec la formation du produit.

L'activation non essentielle décrit une réaction enzymatique qui existe sans activateur, mais dont la formation d'un complexe enzyme-activateur facilite la réaction. La réaction est décrite au schéma de la Figure 10.

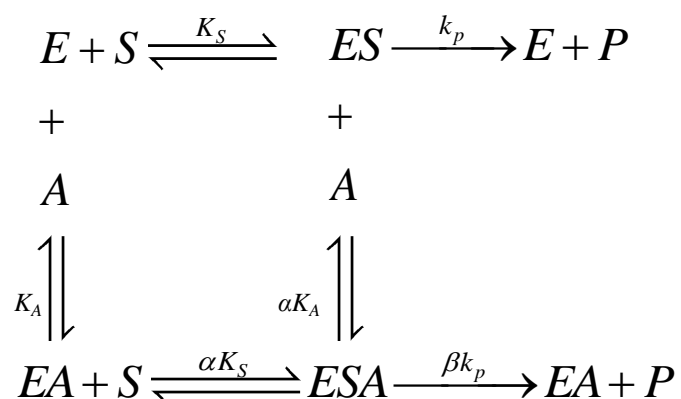


Figure 1.10 Activation non essentielle

Le mécanisme, pour être décrit, fait intervenir les paramètres α et β . La molécule A est un activateur lorsque $\alpha < 1$ et $\beta > 1$. Cette équation peut aussi décrire des systèmes mixtes d'inhibition et d'activation. Par exemple, pour un système où α et β sont inférieurs à 1, A active la formation de produit lorsque $[S]$ est faible et inhibe la formation de produit lorsque $[S]$ est élevée. Dans le cas où $\alpha = 1$ et $\beta = 0$, la molécule A devient un inhibiteur non compétitif.

1.3.1.3. Modélisation de la croissance

Alors que les cinétiques enzymatiques décrivent des processus relativement simples et s'appuie largement sur des équations tirées de processus mécanistiques, la modélisation des dynamiques de croissance décrit un phénomène plus complexe et est largement empirique. L'équation de Monod est la plus utilisée, et celle-ci est de même forme que le mécanisme de Michaelis-Menten. Elle permet de décrire le taux de croissance spécifique d'une culture en fonction de la concentration d'un substrat limitant. Le Tableau 1.5 présente différentes formes d'équations permettant de modéliser le taux de croissance spécifique μ en fonction d'un substrat S (Shuler, et al., 1992).

Tableau 1.5: Équations du taux de croissance spécifique

Modèle	Équation
Équation de Monod	$\frac{\mu_m S}{K_s + S}$
Équation de Tessier	$\mu_m (1 - e^{-KS})$
Équation de Moser	$\frac{\mu_m S^n}{K + S^n}$
Équation de Contois	$\frac{\mu_m S^n}{K_{cv} X + S^n}$
Inhibition par le substrat (non compétitif)	$\frac{\mu_m S}{K_s + S + S^2 / K_I}$
Inhibition par le substrat (compétitif)	$\frac{\mu_m S}{K_s (1 + S / K_I) + S}$

La constante K_S est la constante de saturation de la vitesse de croissance alors que μ_m représente le taux de croissance spécifique maximal, ces deux paramètres étant des corolaires aux

paramètres V_{max} et K_m de la cinétique enzymatique. Advenant le cas où plusieurs substrats peuvent potentiellement limiter la croissance, ce qui est habituellement le cas chez les cellules de mammifère, trois solutions peuvent être alors envisagées (Mahr, 2013; Shuler, et al., 1992). Des cinétiques de type Monod peuvent être multipliées entre elles (équation 1), additionnées entre elles (équation 2) ou seul le substrat le plus limitant peut être considéré (équation 3).

$$\frac{\mu}{\mu_m} = \frac{S_1}{K_{s_1} + S_1} \frac{S_2}{K_{s_2} + S_2} \cdots \frac{S_n}{K_{s_n} + S_n} \quad (1)$$

$$\frac{\mu}{\mu_m} = \frac{K_{s_1}/S_1}{\sum_{i=1}^n K_{s_i}/S_i} \frac{S_1}{K_{s_1} + S_1} + \frac{K_{s_2}/S_2}{\sum_{i=1}^n K_{s_i}/S_i} \frac{S_2}{K_{s_2} + S_2} + \cdots \frac{K_{s_n}/S_n}{\sum_{i=1}^n K_{s_i}/S_i} \frac{S_n}{K_{s_n} + S_n} \quad (2)$$

$$\frac{\mu}{\mu_m} = \frac{S_i}{S_i + K_{s_i}}, \text{ pour le } \frac{S_i}{S_i + K_{s_i}} \text{ le plus faible} \quad (3)$$

Le premier cas est dérivé du mécanisme de vitesse réactionnelle pour une enzyme possédant plusieurs substrats. Chacune des formes peut être utilisée selon les différents cas qui se présentent.

1.3.2 Méthodes d'analyse du métabolisme

Les modèles mathématiques décrivant les cultures de cellules s'intéressent particulièrement aux calculs des flux métaboliques, puisque ceux-ci représentent la dernière étape fonctionnelle de l'expression du génome, du protéome et du métabolome (Niklas et al., 2011). Les modèles utilisés peuvent être classés selon qu'ils sont structurés ou non et ségrégués ou non (Sidoli, et al., 2004). Un modèle non structuré ne considère pas les phénomènes se déroulant à l'intérieur de la cellule, la considérant comme une boîte noire avec des entrées et des sorties. Les modèles structurés considèrent l'intérieur de la cellule soit du point de vue physique, c'est-à-dire en tenant compte du rôle des organelles ou de la structure de la cellule, ou d'un point de vue biochimique, c'est-à-dire en tenant compte des réactions biochimiques des intermédiaires du métabolisme et leurs concentrations, ou combinées. De plus, un modèle ségrégué fait la distinction entre les différentes phases de la croissance pour chacune des cellules ou sous-populations alors qu'un modèle non ségrégué considère la population comme étant homogène. L'inclusion de plus de détails dans un modèle permet d'améliorer sa représentativité biologique, toutefois, cela se fait au

prix d'une plus grande complexité et difficulté dans l'identification des nombreux paramètres du modèle.

1.3.2.1. Analyse des flux métaboliques (MFA)

Alors que traditionnellement les réactions biochimiques étaient étudiées individuellement, l'analyse des flux métaboliques propose d'étudier ces réactions dans leur ensemble et en conditions *in vivo*, ce qui permet une meilleure représentation du métabolisme des cellules en conditions réelles. Le principe de l'analyse des flux métaboliques (MFA) repose sur la stœchiométrie du réseau de réactions du métabolisme en condition de régime permanent ou quasi-permanent. En effectuant un bilan de masse sur les métabolites intermédiaires, il est possible de simplifier le calcul des flux métaboliques à un simple problème d'algèbre linéaire. La Figure 11 illustre un exemple de l'analyse des flux métaboliques sur le métabolite intermédiaire B (Stephanopoulos et al., 1998):

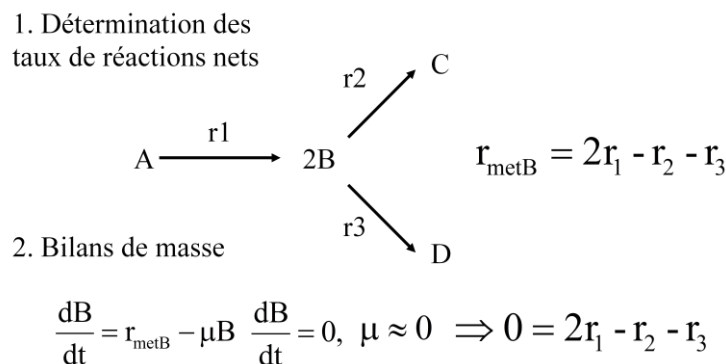


Figure 1.11 Exemple d'analyse des flux métaboliques

Deux hypothèses majeures doivent être posées. Tout d'abord, le taux de dilution dû à la division cellulaire doit être faible ou négligeable, ce qui est généralement le cas puisque les concentrations en métabolites intracellulaires sont très faibles, et donc le taux de dilution est généralement de quelques ordres de grandeur inférieur au taux de réaction. La seconde hypothèse est que la cellule est en régime permanent. Cet équilibre peut être principalement atteint en culture en mode continu (Stephanopoulos, 1999). Dans le cas des cultures cuvées, il est aussi généralement possible de faire l'hypothèse du régime pseudo-permanent pour les métabolites intracellulaires lors de la phase de croissance exponentielle (Antoniewicz, 2013), puisqu'après une perturbation, l'équilibre intracellulaire est généralement atteint en termes de secondes ou de minutes.

L'analyse des flux métaboliques est basée sur les vitesses de consommation et de production des métabolites extracellulaires pour calculer les flux intracellulaires. Cela donne lieu en général à des problèmes sous-déterminés, et la simplification du réseau métabolique doit permettre de trouver une solution au problème. Aussi, il est préférable d'avoir plus de mesures que d'inconnues, afin de pouvoir valider le réseau choisi et les mesures prises (Stephanopoulos, 1999). La capacité d'analyse est limitée par la présence de voies métaboliques parallèles ou de cycles. L'utilisation de substrats marqués aux isotopes ajoutés aux substrats tel le ^{13}C -glucose permet de résoudre ce genre de problème. Cette technique d'analyse a été utilisée pour de nombreux types de microorganismes, incluant les cellules CHO. Entre autres, elle a été utilisée en réacteur en mode continu (Nyberg et al., 1999), en réacteur à perfusion avec l'ajout d'isotopes (Goudar, et al., 2010), en mode cuvée pour comparer différents substrats (C. Altamirano, et al., 2006) et pour comparer les cellules CHO et les hybridomes de souris (Quek et al., 2010). L'utilisation d'isotopes a permis d'analyser les cellules CHO en phase de latence (Sengupta, et al., 2011), de comparer les phases de latence et de croissance (Ahn, et al., 2011), d'observer l'effet du butyrate sur les cellules CHO (Carinhas et al., 2013), de comparer les phases de haute et basse productivité spécifique en anticorps (Templeton, et al., 2013) et d'analyser la répartition des flux métaboliques sur un système dont la phase de production peut être induite (Sheikholeslami et al., 2013). L'analyse des flux métaboliques est avant tout un puissant outil d'analyse, permettant de déterminer les flux métaboliques difficilement déterminables autrement et pouvant orienter l'ingénierie métabolique afin de maximiser la productivité des microorganismes.

1.3.2.2. "Flux Balance Analysis" (FBA)

Outre l'analyse des flux métaboliques, le "Flux Balance Analysis" (FBA) est une variante visant à délimiter un espace de solutions statistique pour l'évaluation des valeurs probables des flux. L'analyse des flux métaboliques tend à simplifier les réseaux métaboliques afin de pouvoir calculer les flux métaboliques en fonction des taux expérimentalement calculés. Au contraire le FBA tend à utiliser des modèles métaboliques à l'échelle du génome, ce qui résulte en un système sous-déterminé. Afin de pouvoir procéder tout de même à la résolution, une contrainte supplémentaire est ajoutée au système d'équation. Bien souvent, en phase exponentielle, le système doit être résolu de manière à maximiser la croissance cellulaire (Orth et al., 2010) afin de pouvoir déterminer un espace de solutions possibles, qui peut être restreint en appliquant des contraintes aux valeurs que peuvent prendre les flux métaboliques. Alors que le but de l'analyse

des flux métaboliques est bien souvent de mesurer *in vivo* les flux, le FBA permet d'évaluer les performances des différents organismes et d'identifier les possibilités au niveau des manipulations génétiques dans le but d'optimiser la productivité (Antoniewicz, 2013). Cette méthode d'analyse, utilisée chez plusieurs types de microorganismes (Boghigian et al., 2010), a aussi été utilisée pour analyser des lignées de cellules de mammifère. Sheikh et al. (2005) ont utilisé cette technique avec une lignée d'hybridomes de souris et un réseau métabolique à l'échelle génomique, maximisant successivement le taux de croissance, la consommation en substrat et le taux de production d'anticorps. Selvarus et al. (2012) ont combiné cette technique à une analyse exhaustive du métabolome sur des cellules CHO en phase de croissance et de latence pour identifier les réactions et facteurs limitant la croissance tandis que cette technique a aussi permis de comparer le métabolisme de cellules CHO en phase de production et de consommation de lactate (Martínez et al., 2013).

1.3.2.3. Analyse du contrôle métabolique (MCA)

Alors que les approches mentionnées aux sections précédentes visent habituellement à identifier les étapes limitantes du métabolisme dans un but d'optimisation par ingénierie métabolique de manière plus ou moins qualitative, l'analyse du contrôle métabolique permet de déterminer quantitativement le degré de contrôle qu'un enzyme spécifique exerce sur une voie métabolique donnée et permet d'établir la structure de régulation à l'intérieur de cette même voie métabolique (Moreno-Sánchez et al., 2008). Cette méthode repose sur le calcul des coefficients de contrôle des flux. L'équation suivante (Fell, 1998) représente la définition de ce coefficient pour le flux de grandeur J par rapport à l'enzyme i de concentration E_i .

$$C_i^J = \frac{\partial J}{\partial E_i} * \frac{E_i}{J} = \frac{\partial \ln J}{\partial \ln E_i}$$

Pour un même système, l'ensemble des coefficients de contrôle doit être égal à 1 pour un flux donné, donc une enzyme avec un coefficient près de 1 aura une très forte influence sur ce flux. Cette méthode peut s'appliquer aussi bien à l'influence des enzymes sur un flux ou une concentration d'un métabolite intermédiaire. La détermination de ces coefficients peut être effectuée entre autres *in silico* par l'utilisation d'un modèle cinétique du métabolisme (Moreno-Sánchez, et al., 2008), l'analyse du contrôle métabolique étant alors un puissant outil d'optimisation du métabolisme dans ces conditions.

1.3.2.4. Approche dynamique

Une des limitations de l'analyse des flux métaboliques et du FBA est que ces deux approches nécessitent le calcul des taux de consommation et de production extracellulaires pour identifier précisément les flux intracellulaires, qui sont non mesurés. Or, ces vitesses peuvent varier au cours d'une même culture, même en cours de croissance exponentielle. Pour pouvoir utiliser ces méthodes de manière dynamique et donc de décrire une culture cellulaire sur toute sa durée ou lors de perturbations, quatre approches peuvent être employées (Antoniewicz, 2013). Il est possible de séparer la culture en plusieurs étapes distinctes en terme de régime, par exemple en une phase de croissance et une phase de plateau, et de calculer des flux uniques pour chacune des phases (Ahn, et al., 2011; Gao, et al., 2007; Provost, et al., 2006). Il est aussi possible, par lissage de données, de calculer la variation instantanée des flux extracellulaires en fonction du temps pour la durée de la culture et d'obtenir ainsi la distribution des flux en fonction du temps (Llaneras et al., 2007). Le lissage des données peut être fait sur les valeurs de flux ou les concentrations extracellulaires elles-mêmes (Antoniewicz, 2013). La dernière méthode consiste à utiliser un modèle cinétique pour simuler les variations de concentrations extracellulaires et appliquer l'analyse des flux métaboliques à partir des résultats obtenus. Cette dernière méthode a l'avantage d'être indépendante du temps, toutefois elle nécessite l'élaboration d'un modèle cinétique plus complexe et l'identification de nombreux paramètres cinétiques.

1.3.3 Approches de modélisation des cultures en mode cuvée-alimentée

L'approche traditionnelle de modélisation des cultures de cellules de mammifère en mode cuvée alimentée a été le développement de modèles non-structurés appliqués aux hybridomes de souris (M De Tremblay et al., 1992; M. W. Glacken et al., 1989; Jang et al., 2000), ces modèles pouvant servir aussi bien à l'optimisation des stratégies d'alimentation que l'implémentation de boucles de contrôles (M. de Tremblay et al., 1993). Toutefois, ces modèles ne tiennent pas compte des réactions intracellulaires, ce qui limite leur intérêt puisque ceux-ci ne décrivent pas implicitement les changements métaboliques pouvant se produire en cours de culture. Les modèles hybrides permettant à la fois l'analyse des flux métaboliques et la description des cinétiques des macro-réactions décrivant la consommation et la production des métabolites extracellulaires, faisant le lien entre les flux intracellulaires et l'environnement extracellulaire. Provost et Bastin (2004) ont proposé un modèle décrivant les cellules CHO de manière dynamique en phase de croissance en

mode cuvée en posant l'hypothèse que les concentrations intracellulaires des métabolites étaient en régime permanent, comme c'est le cas dans le cadre de l'analyse des flux métaboliques, en utilisant le taux de croissance spécifique comme entrée du modèle. Ce modèle a par la suite été appliqué à toute la culture en le séparant en trois phases distinctes de culture: la phase de croissance, la phase de "transition" et la phase de mortalité cellulaire (Provost, et al., 2006). Une approche semblable a été utilisée pour les cellules hybridomes en mode cuvée alimentée en deux phases distinctes en ajoutant la simulation de la croissance et de l'apoptose (P. Dorka, et al., 2009; Gao, et al., 2007). Dans ces cas, l'utilisation des données relatives aux flux intracellulaires permet d'établir et de simplifier le modèle, les équations cinétiques des réactions macroscopiques étant établies par la suite.

Les modèles mentionnés plus haut font le lien entre les concentrations extracellulaires et la répartition des flux métaboliques intracellulaires. Toutefois, ils ne sont pas entièrement cinétiques puisque les flux intracellulaires sont mesurés et non décrits par des cinétiques établies. Une approche dynamique globale incluant une description cinétique pour les flux intracellulaires nécessite des mesures de métabolites intracellulaires (Provost, et al., 2004). Nolan et Lee (2011) ont contourné cette difficulté en incluant des cinétiques pour les réactions se déroulant dans le cytosol qui dépendent des concentrations extracellulaires observées et du ratio NADH/NAD^+ , permettant de simuler des cultures de cellules CHO en mode cuvée alimentée avec un changement de température. Toutefois, cette méthode fait l'hypothèse du régime quasi-permanent à propos des métabolites intracellulaires, seuls les valeurs des flux variant. Or, l'observation des tendances chez les métabolites intracellulaires des cellules CHO peut permettre d'optimiser les stratégies d'alimentation (Sellick et al., 2011). Un modèle entièrement dynamique permettant de simuler les concentrations des métabolites intracellulaires et extracellulaires a déjà été développé pour *Escherichia coli* (Chassagnole et al., 2002), les cellules de plantes (Cloutier et al., 2007; Valancin et al., 2013), et la culture de cellules CHO en mode cuvée (Ghorbaniaghdam, et al., 2013). Ce dernier modèle a été calibré pour pouvoir simuler la réponse du métabolisme d'une culture de cellules CHO à une perturbation au butyrate de sodium, un agent permettant d'augmenter la productivité spécifique des cellules. Le même modèle a été utilisé dans un second temps pour décrire différents clones d'une même lignée dont la production d'anticorps est activée en présence de cumate (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014). Le modèle a permis de décrire les différents profils métaboliques des clones qui possédaient des productivités spécifiques en

anticorps différentes. Finalement, l'intégration de régulations métaboliques de la glycolyse au modèle a permis de décrire *in silico* les changements métaboliques associés à une privation soudaine en oxygène (Ghorbaniaghdam, Henry, et al., 2014). Toutefois, ces travaux ont été effectués sur des cultures en mode cuvée. Il n'existe pas en ce moment de modèle permettant de simuler les variations des concentrations intracellulaires de manière dynamique lorsque les cellules sont soumises à des perturbations sur les concentrations extracellulaires. Une simulation dynamique d'une culture en mode cuvée alimentée devrait idéalement permettre de reproduire et prédire le comportement des cellules au niveau intracellulaire lorsque la culture est alimentée. Il s'agit du but du présent projet, qui a consisté à développer un modèle cinétique permettant de relier les perturbations extracellulaires aux variations du milieu extracellulaire afin de pouvoir prédire le comportement de cellules en de telles conditions.

En résumé, la production d'anticorps monoclonaux par la culture de cellules CHO est un procédé pour lequel il subsiste encore des pistes d'amélioration. L'utilisation du mode cuvée-alimenté permet d'obtenir des résultats intéressants, toutefois sa planification et son application repose largement sur l'intuition et la réalisation de plans expérimentaux à grande échelle. L'étude rigoureuse du métabolisme des cellules CHO et sa caractérisation, généralement par le biais de l'analyse des flux métaboliques, permet de suggérer des pistes à partir desquelles une stratégie d'alimentation en mode cuvée-alimentée peut être élaborée de manière plus rationnelle. L'utilisation d'un modèle dynamique du métabolisme, basée ici sur les concentrations extracellulaires et intracellulaires, est à la fois un puissant outil d'analyse du métabolisme afin d'identifier les tendances majeures du métabolisme en mode cuvée-alimentée, mais aussi peut être perçu comme un outil prédictif, permettant, de manière parallèle à l'expérimentation, l'élaboration de stratégies d'alimentation. C'est dans ce contexte que le modèle dynamique proposé dans le cadre de ce mémoire se place.

CHAPITRE 2 ARTICLE 1: A SINGLE DYNAMIC METABOLIC MODEL CAN DESCRIBE MAB PRODUCING CHO CELL BATCH AND FED-BATCH CULTURES ON DIFFERENT CULTURE MEDIA

Julien Robitaille, Jingkui Chen, Mario Jolicoeur^{*}

Research Laboratory in Applied Metabolic Engineering, Department of Chemical Engineering,
École polytechnique de Montréal, C.P. 6079, succ. Centre-ville, Montreal (Quebec) H3C 3A7

^{*}Corresponding author

Email: mario.jolicoeur@polymtl.ca (**MJ**)

2.1 Présentation de l'article

Cette section reprend l'article intitulé «A Single Dynamic Metabolic Model Can Describe mAb Producing CHO Cell Batch and Fed-batch Cultures on Different Culture Media», qui a été soumis à la revue PLOS Computational Biology. Cet article vise à présenter le modèle qui a été développé dans le cadre de ce mémoire et qui décrit le métabolisme de cellules CHO, c'est-à-dire la structure du modèle, les équations décrivant le modèle et les valeurs des paramètres cinétiques. Le modèle a été calibré en utilisant quatre expériences distinctes en bioréacteurs, une culture en mode cuvée et une culture en mode cuvée-alimentée pour deux milieux de culture différents. Les résultats obtenus suggèrent qu'un seul modèle utilisant un seul ensemble de paramètres est suffisant pour décrire les quatre cultures utilisées pour calibrer le modèle, ce qui suggère que le même modèle pourrait être employé afin de tester différentes stratégies d'alimentation. En outre, les mesures de flux métaboliques obtenues et leur distribution indiquent la rigidité du métabolisme cellulaire et suggèrent que celui-ci, étant hautement régulé, est peu sensible aux modifications de son environnement.

2.2 Abstract

High productivity in CHO cell culture relies on optimized culture medium management under fed-batch strategies. In this work, a dynamic metabolic model for CHO cells was further developed, calibrated and challenged using datasets obtained under four different culture conditions, including two batch and two fed-batch cultures comparing two different culture media. The recombinant CHO-DXB11 cell line producing the EG2-hFc monoclonal antibody was studied. Quantification of extracellular substrates and metabolites concentrations, viable cell density, monoclonal antibody concentration and intracellular concentrations of metabolite intermediates of glycolysis, pentose-phosphate and TCA cycle, as well as of energetic nucleotides, were obtained for model calibration. Our results suggest that a single model structure with a single set of kinetic parameter values is efficient at simulating the cell behavior in all cases under study, from the start of the culture until cell viability declines, estimating the time course of measured and non-measured intracellular and extracellular metabolites. Model simulations also allowed performing dynamic metabolic flux analysis, showing that the culture media used and the fed-batch strategies tested had little impact on flux distribution. Our work thus presents a dynamic metabolic model paving the way to the development of an *in silico* platform allowing to assess the performance of different culture media and fed-batch strategies.

2.3 Introduction

Monoclonal antibody (mAb) production at industrial level has reached, over the last decades, a 100-fold increase of the titers with up to 10 g L^{-1} (J. Y. Kim, et al., 2012). This significant improvement can be explained by the ability to maintain very high cell concentrations ($>10^7 \text{ cells mL}^{-1}$) at high viability for an extended period of time (i.e. weeks), a level of achievement resulting from the optimization of culture media composition coupled with efficient fed-batch strategies (Hacker et al., 2009). Serum-free media are complex to elaborate, because of a high number of essential and non-essential nutrients as well as a growth factors cocktail stimulating cell growth, viability and productivity in a recombinant product. Statistical methods, within a design of experiment approach, have been widely used to design culture media composition, both for screening active factors (Castro et al., 1992; Sandadi, et al., 2006) and for optimizing component concentrations (Parampalli et al., 2007; Sen et al., 2013). The integration of the

knowledge acquired over the past decades on optimal media composition allowed to extent culture duration in time-based fed-batch strategies overcoming culture media limitations. Efficient fed-batch strategies are thus designed to maximize growth and/or cell viability, while limiting the production of metabolic wastes, such as lactate and ammonia, which inhibit cell growth and affect the mAb product production and quality (Butler, 2005). Indeed, various fed-batch approaches have been proposed such as from the stoichiometric feeding of nutrients as they are consumed by the cells (Xie et al., 1994a), a feeding determined from a statistical design (H. Zhang, et al., 2013) or from the online control of glucose and glutamine at low level to favour a more efficient metabolism (Chee Fung Wong et al., 2005b; Europa, et al., 2000). Those approaches rely mostly on time-consuming experimentation schedules because of the large number of data sets needed, and are determined either intuitively or randomly. They are not based on comprehensive mechanistic relationships that could help understanding how cells interact with their culture medium.

Metabolic flux analysis (MFA) and flux balance analysis (FBA) studies have been also conducted on CHO cells (Martínez, et al., 2013; Nyberg, et al., 1999; Selvarasu, et al., 2012; Sengupta, et al., 2011). These works, performed under steady-state conditions, can provide a snapshot image of intracellular flux distribution and are helpful to analyze and compare specific culture phases. The active fluxes during growth and non-growth phases have been identified (Ahn, et al., 2011) as well as during the production phase (Templeton, et al., 2013). Moreover, MFA and FBA approaches are particularly useful to elucidate a metabolic network structure, such as the lactate and glutamine metabolisms, by the use of labelled substrates (Ahn, et al., 2011; Goudar, et al., 2010; Sengupta, et al., 2011; Sheikholeslami, et al., 2013). However, these MFA and FBA approaches are not predictive neither they can explain metabolic shifts or time-course of a culture behaviour, dynamic approaches being more appropriate for developing an *in silico* platform (Herwig et al., 2002; Lequeux et al., 2010; Mahadevan et al., 2002).

Provost and Bastin (2004) and Gao et al. (2007) have proposed metabolic models for mammalian cells linking extracellular fluxes to extracellular concentrations and intracellular fluxes. A similar model by Naderi et al. (2011), accounting for dead cells, was able to simulate several batch and fed-batch cultures after calibration on a batch culture. This kind of models, however, only allows limited predictive capacity since the culture still has to be divided in two or more phases to cope with changes occurring with intracellular fluxes distribution. Nolan and Lee (2011) have

proposed a dynamic model to simulate external and cytosolic flux kinetics, based on extracellular concentrations and redox state for both batch and fed-batch CHO cell cultures. However, by making the pseudo steady-state assumption on intracellular fluxes, this kind of model can hardly predict intracellular metabolites concentrations with time. Based on previous works on plant cells (Cloutier, et al., 2007; Valancin, et al., 2013), a kinetic model describing intracellular and extracellular metabolites concentrations as well as metabolic fluxes variation with time was transposed to various CHO cell lines (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014; Ghorbaniaghdam, et al., 2013) as well as brain cells (Poliquin et al., 2013). The model successfully described CHO cell batch cultures for recombinant protein (t-PA) (Ghorbaniaghdam, et al., 2013) and mAb (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014) production, characterizing differences between high and low producer clones through model parameters identification and simulations of metabolic flux and flux ratios with culture time. In the present work, the dynamic model was further studied and developed being challenged with different culture media and fed-batch strategies. CHO cells were thus cultivated under four different experimental conditions, batch and fed-batch cultures using two different culture media, and the metabolomic data sets were used to perform model parameters calibration. Our results show that a unique set of model parameter values allows the dynamic metabolic model to describe the different culture conditions tested.

2.4 Material and Methods

2.4.1 Cultures

Four different CHO cell cultures were performed to calibrate the model. The CHO-DXB11 cell line, producing a chimeric heavy chain monoclonal antibody (EG2-hFc) (Agrawal et al., 2012), has been provided by Dr. Yves Durocher of the NRC (Montreal, Quebec, Canada). Each culture was inoculated at 2×10^5 cells mL⁻¹ in a 2-L Labfors 4 bioreactor (Infors Ag, Bottmingen, Switzerland). Cultures were performed at 37 °C and dissolved oxygen was maintained at 50 % of air saturation by surface aeration. pH control at pH 7 was performed by feeding CO₂ in surface aeration and NaOH (1 M) addition was used when CO₂ reached a concentration lower than 0.5 % of the gas feed. Agitation (pitched-blade impeller) speed was set at 60 RPM at inoculation and was then gradually increased up to 120 RPM to follow the cells oxygen demand, from reaching a maximal O₂ concentration of the total gas flow rate of 100 %.. Cultures were performed until cell

viability decreased below 50 %. Samples were taken daily for cell counting and cell viability determination, as well as for glucose concentration in the media. In fed-batch cultures, nutrients addition was performed daily to avoid limitations, based on the extracellular glucose concentration, maintaining the concentration above 10 mM. The remaining sample was then centrifuged at 100 g and the supernatant was frozen (-80 °C) and kept for further analysis of media composition. Cell extractions, for the quantification of intracellular metabolites, were performed as described in Ghorbaniadgdam et al. (2014). Briefly, 3×10^6 cells were collected and washed 2 times with cold PBS, and then extracted in three steps with cold methanol, while vortexed with 0.2 g of sand (Sigma, Oakville, Canada, cat. # 274739), sonicated in ice bath for 5 min and then centrifuged at 21000 g between each steps. Respiration assays were performed daily from 48 h, by closing the bioreactor inlet gas flow rate and decreasing the agitation speed (30 RPM), which allows to minimize the O₂ transfer while maintaining an homogeneous cell suspension, until the dissolved oxygen level reach 35 % of air saturation.

Two different culture media were tested, the Biogro-CHO (Biogro Technologies, Winnipeg, Canada) without glucose and glutamine (see below for concentrations) and the PowerCHO-2 (Sartorius AG, Goettingen, Germany, cat. # WPW-088D) without glutamine (see below for concentration). The Biogro-CHO medium was supplemented with 25 mM and 10 mM glucose (Sigma, Oakville, Canada, cat. # G7021), and with 4 mM and 2.4 mM glutamine (Sigma, Oakville, Canada, cat. # G7513), for batch and fed-batch cultures respectively. The PowerCHO-2 medium was supplemented with 6.5 mM glutamine and 1 mL Anti-Clumping Agent per liter of culture medium (Life Technologies Inc., Burlington, Canada, cat. # 01-0057AE).

Two fed-batch strategies were defined based on the two culture media specific composition. Previous work with the same cell line aiming at identifying limiting nutrients in both Biogro-CHO and PowerCHO-2 media (data not shown) suggested that neither glucose nor amino acids are the substrates limiting cell growth; the individual effects of each compound were evaluated from a fractional experimental plan. Based on those results, with glucose and glutamine being the fastest consumed substrates, medium feed for Biogro-CHO fed-batch cultures was composed of regular medium at 13X glucose (130 mM) and 8X glutamine (25 mM) concentrations (i.e. below solubility limits). The fed-batch culture performed with the PowerCHO-2 medium was fed with a 2.5X concentrated PowerCHO-2 medium (100 mM glucose and 16 mM glutamine). That strategy allowed avoiding early nutritional limitation for the measured components. For both culture

media, a fed-batch with daily feeding and a control batch culture were performed in parallel. Samples for all analysis were taken daily, except for the batch culture with the Biogro-CHO, for which the samples were taken every 12 h to better monitor the culture dynamics, since this culture duration showed being shorter than the others.

2.4.2 Analytical methods

Viable cell concentration was determined by cell counting using a hemocytometer and trypan blue (Sigma, Oakville, Canada, cat # TB154) exclusion method. Extracellular concentrations for glucose, lactate, glutamine and glutamate were analyzed using a YSI 2700 SELECT Biochemistry Analyzer (YSI, Yellow Springs, USA). Ammonia concentration was measured with the Ammonia Assay Kit (Sigma, Oakville, Canada, cat. # A0100). Amino acids concentrations were determined using a Agilent 1290 HPLC system (Agilent Technologies, Montreal, Quebec, Canada) as described in Ghorbaniadgdam et al. (2014). Isoleucine and leucine peaks were not distinct, so isoleucine concentration in this work was taken as the sum of isoleucine and leucine concentrations, for experimental data as well as in the model. The intracellular extracts were analyzed for nucleotides, organic acids and sugar phosphates concentrations as described in Ghorbaniadgdam et al. (2014) using a UPLC MS/MS System (Agilent technologies, Montreal, Quebec, Canada).

Monoclonal antibody concentration was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A Costar 96-well plate (Corning Life Sciences Plastic, Corning, United States, cat. # 3369) was first incubated overnight with Fc specific Anti-Human IgG (Sigma, Oakville, Canada, cat. # I2136) diluted to 1/30000 in phosphate saline buffer (PBS). The wells were washed with PBS solution containing 0.2 % Tween 20 (Sigma, Oakville, Canada, cat. #P7949). The remaining sites were then blocked using a solution of PBS containing 0.3 g L⁻¹ of Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma, Oakville, Canada, cat. # A7030) incubated for 1 h. The wells were washed and filled with either standard or the sample diluted 1000 to 16000 times in a PBS-BSA solution and incubated for 1 h. The wells were then washed and incubated 1 h with peroxidase conjugated Anti-Human IgG (Sigma, Oakville, Canada, cat. # A0170). The reaction was revealed with 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (Sigma, Oakville, Canada, cat. # A0170), stopped after 20 min using 2 M H₂SO₄ and the absorbance measured at 450 nm with a Victor 3V multilabel reader (PerkinElmer, Waltham, United States).

2.4.3 Model structure

The mathematical model presented in this work is based on a previous model developed for other two CHO cell lines (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014; Ghorbaniaghdam, et al., 2013; Ghorbaniaghdam, Henry, et al., 2014), as mentioned above. The metabolic network defining the model structure (Figure 2.1) and the biochemical reactions stoichiometry (Tableau 2.2) have been adapted to the cell line cultured in this study as well as the recombinant mAb produced. The model includes the major pathways such as glycolysis, TCA cycle and pentose phosphate pathway, as well as the pathways for energy production (oxidative phosphorylation) and consumption (ATPases, and anabolic reactions for cell division and mAb synthesis). The major pathways for amino acids metabolism are also described, with glutaminolysis, aspartate and alanine transaminase (V_{ASTA} and V_{AlaTA}), serine conversion to pyruvate (V_{SDHH}), as well as amino acids conversion to alpha ketoglutarate and succinate in distinct reactions ($V_{AAtoSUC}$ and $V_{HISARGTA}$ respectively). The biochemical reactions stoichiometry was preserved from the previous model. Metabolite pool consumption for cell growth was that proposed in Sheik et al. (2005) for cell composition, as well as of an average molecular weight of 107.5 g mol^{-1} for the cell proteins in biomass and of a conversion factor of $3.15 \times 10^{-4} \text{ gDW } 10^{-6} \text{ cells}$. For simplification purposes, the assumption was made that all the lipids within the biomass were derived from citrate, the nucleotides precursors issued from ribulose-5-phosphate and glycogen from glucose-6-phosphate. Amino acids consumption for mAb synthesis was calculated from the average IgG1 sequence proposed in Quek et al. (Quek, et al., 2010). ATP consumption for both cell growth and mAb synthesis are as described in Nolan & Lee (2011). Also, a subset of the non-measured metabolites, and associated enzymes, that were considered in the previous model (creatine, phosphocreatine, coenzyme-A, phosphate and intracellular oxygen) were not considered here in this work.

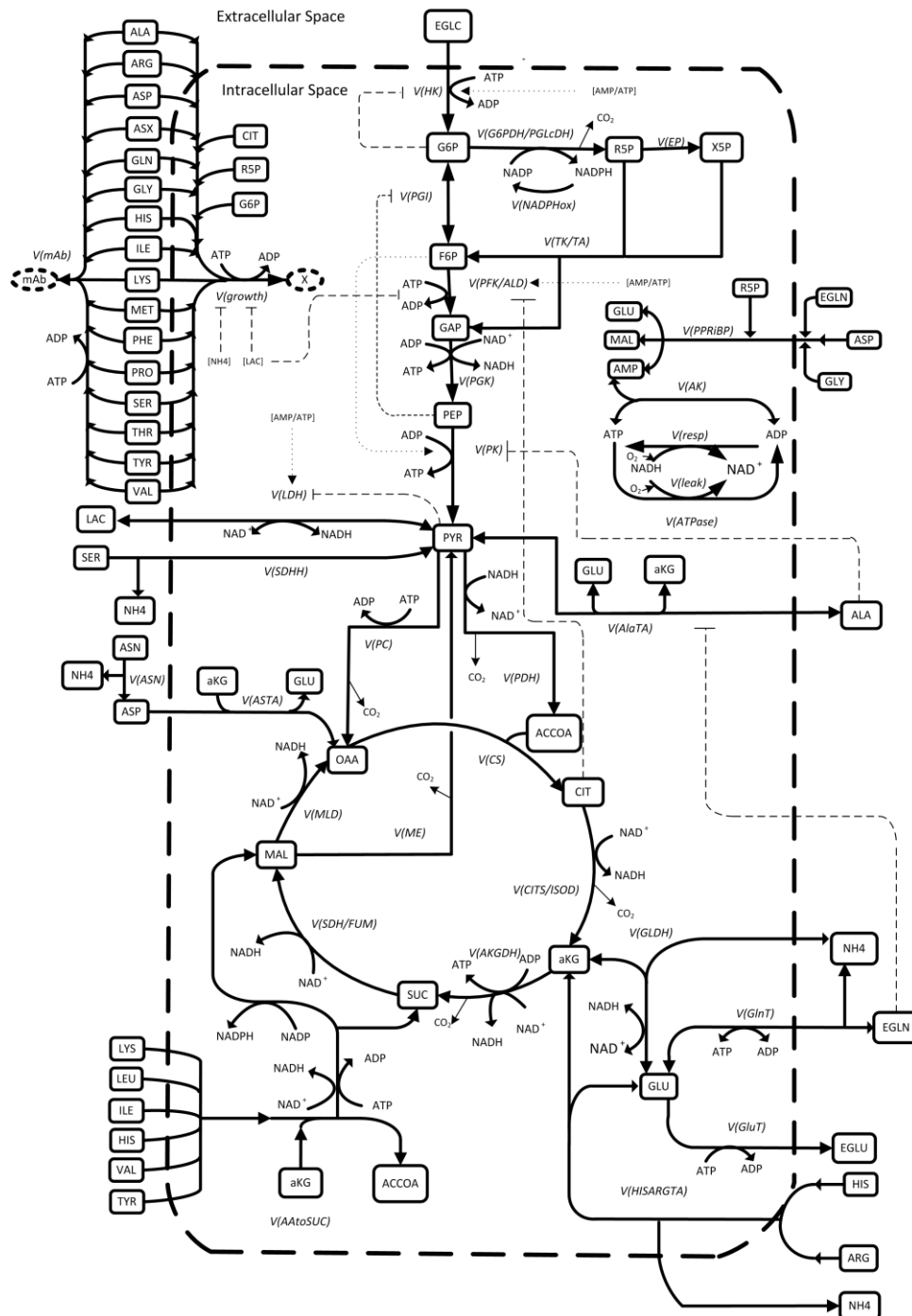


Figure 2.1 Metabolic network described by the model.

Solid lines represent biochemical reactions, dashed lines represent inhibition mechanisms and dotted lines represent activation mechanisms

2.4.4 Mathematical description of the fluxes

Most of fluxes kinetics are as previously described (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014; Ghorbaniaghdam, et al., 2013; Ghorbaniaghdam, Henry, et al., 2014) (Tableau 2.3). All kinetic equations in this work are based on mechanistic formulations known as biologically relevant, rather than using empirical equations. Reactions rates are composed of multiplicative Michaelis-Menten kinetics accounting for each substrates involved. In the case of energetic nucleotides, ratios are used (ATP/ADP, NADH/NAD, NADP/NADPH, ADP/ATP, NAD/NADH, NADPH/NADP). This approach was successful in another work on the modeling of the metabolism of skeletal muscle cells (Dash et al., 2008) as well as in our previous work on that modelling approach also applied to CHO cells [29, 30, 33]. The regulation of glycolysis is as previously described (Ghorbaniaghdam, Henry, et al., 2014), with feedback inhibition phenomena of hexokinase (V_{HK}), phosphoglucose isomerase (V_{PGI}), and reverse lactate dehydrogenase (V_{rLDH}) by glucose-6-phosphate, phosphoenolpyruvate and pyruvate, respectively. The AMP-to-ATP ratio activates phosphofructokinase (V_{PFK}), lactate dehydrogenase (V_{LDH}) and V_{HK} , while fructose-6-phosphate activates pyruvate kinase (V_{PK}). The reactions involving an inhibition mechanism were described according to the mathematical formulation of a non-competitive inhibition (Eq. 1). However, the reaction mechanism used to describe activation phenomena is that for non-essential activation as proposed in (Segel, 1993) (Eq. 2).

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m (1 + [I] / K_I)} \quad (1)$$

$$V = \frac{V_{\max} [S] (1 + \beta [A] / \alpha K_A)}{K_S (1 + [A] / K_A) + [S] (1 + [A] / \alpha K_A)} \quad (2)$$

In the present work, V_{PFK} is inhibited by intracellular citrate and extracellular lactate (Leite et al., 2011; Mulukutla, et al., 2010), and V_{PK} is inhibited by alanine (Berg, et al., 2002; Llorente et al., 1970). The reverse reaction of alanine aminotransferase (V_{rAlaTA}) is also inhibited by glutamine to account for the switch from alanine production to alanine consumption when glutamine level is low, as observed in our experimental data. Reverse reactions are also modeled for glutamine synthetase (V_{GlnT}), glutamate dehydrogenase (V_{GLDH}), lactate dehydrogenase (V_{LDH}), glutamate transport (V_{GluT}) and adenylate kinase (V_{AK}), but not for V_{ASTA} because there was no evidence from our measurements of a net production of extracellular aspartate, but only a net consumption.

The cell specific growth rate is modeled as a multiplicative Michaelis-Menten mechanism accounting for major precursors of cell building blocks, an approach that has been previously successfully applied to plant (Cloutier, et al., 2007) and mammalian cells (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014; Ghorbaniaghdam, et al., 2013; Poliquin, et al., 2013). Therefore, in this work, all extracellular amino acids included in the model were considered, as well as the intracellular levels of glucose-6-phosphate, citrate and ribulose-5-phosphate, which act as the respective precursors for glycogen, proteins and lipids, and nucleotides such as DNA and RNA. For each of those species, a different affinity constant was determined, to represent the situation when one species, for example glutamine, is nearly depleted without significantly affecting the growth rate. Another set of affinity constants was also used to describe the mAb production rate. Finally, inhibitory effects of lactate and ammonia on the growth rate were added to account for their accumulation in the culture media. A non-competitive inhibition mechanism was applied (Z. Z. Xing et al., 2010), with a distinct affinity constant for lactate regarding the growth (Tableau 2.3, Equation 33) and V_{PFK} (Tableau 2.3, Equation 3) reactions.

2.4.5 Sensitivity analysis

The model structure and flux kinetics formulation resulted in a large number of parameters (139). Before proceeding with the calibration step of the model, the parameters were analysed in order to identify and only optimize the value of the most sensitive ones. The Morris Screening method was used for determining the ranking of the global sensitivity of each parameters, an approach previously applied to a similar dynamic model (Mailier et al., 2011; Sin et al., 2009). This technique allows to cover efficiently a wide sample space returning the distribution of the elementary effect in that space (Morris, 1991). The absolute value of the mean indicates the sensitivity of the parameter and the standard deviation gives an approximation of the linearity of the parameter. The elementary effect of a parameter p_i on the output of an objective function f can be defined as follow (Eq. 4):

$$EE_i(p) = f(p_1, p_2, \dots, p_{i-1}, p_i + \Delta, p_{i+1}, \dots, p_k) / \Delta \quad (4)$$

The elementary effect was calculated 35 times for each parameter using a step Δ of 2/3 and the boundaries were set to ± 25 % of the initial guess. The function's outputs were the function evaluation at the experimental sampling times for the selected 32 outputs chosen for optimization

(the ones represented in Figures 2.2-2.4 and 2.9-2.11). The outputs were weighted using their standard deviation, as it is the case in the parameter optimization routine. The mean of all the outputs in absolute value at all the time points was used to determine a single sensitivity value for each parameter. The parameters were then ranked according to their global sensitivity and the most sensitive ones were identified. The use of the mean for all outputs was to allow the result to be a single value that can be easily ranked, considering the large number of outputs involved.

2.4.6 Parameter estimation and confidence intervals

The initial guess for all parameters were those from previous work (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014). The K_m 's of the specific growth rate and the mAb production rate were first assumed to be lower than for the K_m of the biochemical reactions. The first step consisted in manually changing the parameter values to verifying the reliability of simulations compared to experimental data, for the complete culture time. Then, using the least square optimization function from MATLAB ToolBox (MathWorks), optimization was performed with the following objective function, the parameter vector p representing the 20 most sensitive parameters:

$$\min\left(\sum_{n=1}^N \sum_{t=1}^T \left(\frac{y_{n,t}^{\text{exp}} - y_{n,t}(p)}{\sigma_{n,t}} \right)^2\right) \quad (5)$$

where $y_{n,t}(p)$ is the n^{th} model output evaluated at the t^{th} experimental time, y^{exp} is the experimental data and σ is the standard deviation of the experimental measurement. Experimental data from 24 h after inoculation to when the cell viability decreased under 95 % were considered and the molecular species used for optimization are the same as for sensitivity. The parameter values were also normalized to its order of magnitude (10^n) to improve the optimization process by allowing similar weight to each parameter. The lower bounds for all parameters were set to 0. Finally, flux values and the 95 % confidence interval for each optimized parameter were calculated using the MATLAB built-in functions *nlparci* and *nlpredci* as well as the Jacobian matrix from the *lsqcurvefit* function. When available, initial conditions were taken from experimental data or from (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014) otherwise (see Tableau 2.4 for initial conditions).

Five different optimization procedures were performed: using the four culture data sets, focusing on the two cultures performed with Biogro-CHO, on the two cultures performed with

PowerCHO-2, using data from the two fed-batch cultures or using data from only the two control batch cultures. The parameter values were initially obtained considering all four cultures, and those values were taken as the initial guess feeding the four other optimizations. The goal was to be able to compare the parameter confidence intervals from two different subsets of whole data sets. First, the batch cultures as a whole were compared to the fed-batch culture, then the cultures with Biogro-CHO medium, independently of their culture mode, were compared to the PowerCHO-2 cultures. In a similar way, data sets from each culture were also divided into two phases based on cell growth behaviour before and after 72 h, which corresponds approximately to the mid-exponential phase. The parameters were first optimized with a data set that corresponded to the first 72 h for all cultures, followed by a second optimization step from 72 h to the end of the culture, for all 4 cases. The parameter initial guess (at $t=0$) were the same in each case. The goal was to evaluate the appropriateness of dividing the model in 2 culture phases.

2.5 Results and Discussion

2.5.1 The culture medium is a primary factor in cell culture behaviour

All cultures were performed until cell viability reached 50%, which occurred at 144 h and 216 h for batch cultures using Biogro-CHO and PowerCHO-2 respectively, and after 192 h and 360 h for the fed-batch cultures (Figure 2.2B). The PowerCHO-2 medium design thus allowed maintaining high cell viability for an extended time period in batch and fed-batch cultures compared to Biogro-CHO. Moreover, both PowerCHO-2 cultures led to higher maximum viable cell concentrations (Figure 2.2A) and higher mAb titers (Figure 2.2C) (6.0×10^6 cells mL^{-1} and 69 mg mAb L^{-1} for the fed-batch culture, and 8.2×10^6 cells mL^{-1} and 67 mg mAb L^{-1} for the batch culture) than the cultures using Biogro-CHO (3.0×10^6 cells mL^{-1} and 14.9 mg L^{-1} for the fed-batch culture, 2.7×10^6 cells mL^{-1} and 12.1 mg L^{-1} for the batch culture). High non-limiting glucose condition (Figure 2.2D), such as in the Biogro-CHO fed-batch culture, has not resulted in higher culture performance, nor maintaining high glutamine concentration since the PowerCHO-2 batch culture exhibits sustained growth in absence of glutamine (Figure 2.3A). However, the PowerCHO-2 medium contains more aspartate, asparagine, isoleucine, arginine and serine than the Biogro-CHO (Figure 2.3), most probably fuelling cell metabolism for an extended culture period. The differences in culture behaviour between the two media can thus be attributed to the

balance of PowerCHO-2 component concentrations and ratios. Therefore, with a significant medium effect on cell behaviour, the selected experimental space appeared appropriate for studying the dynamic model robustness.

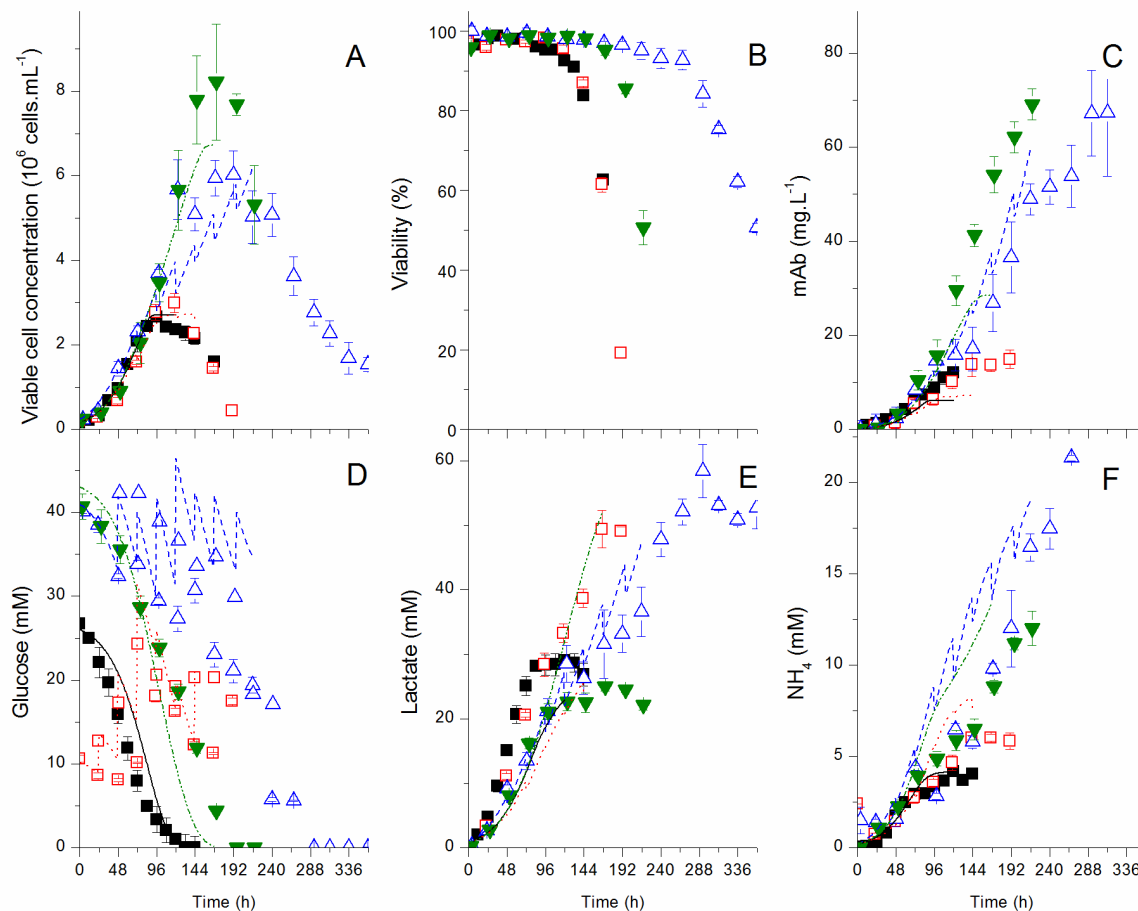


Figure 2.2 Experimental and model simulation results for cells and major extracellular components.

Experimental (symbols) and model simulation (lines) results for the batch (filled symbols) and the fed-batch (empty symbols) cultures using the Biogro-CHO medium (squares) or the PowerCHO-2 medium (triangles). Model simulated results for the batch cultures using Biogro-CHO (straight line - black) and PowerCHO-2 (dash and dot line - green), and fed-batch cultures using Biogro-CHO (dot line - red) and PowerCHO-2 (dash line - blue) for all results except for cell viability in B. All simulations obtained from a unique model.

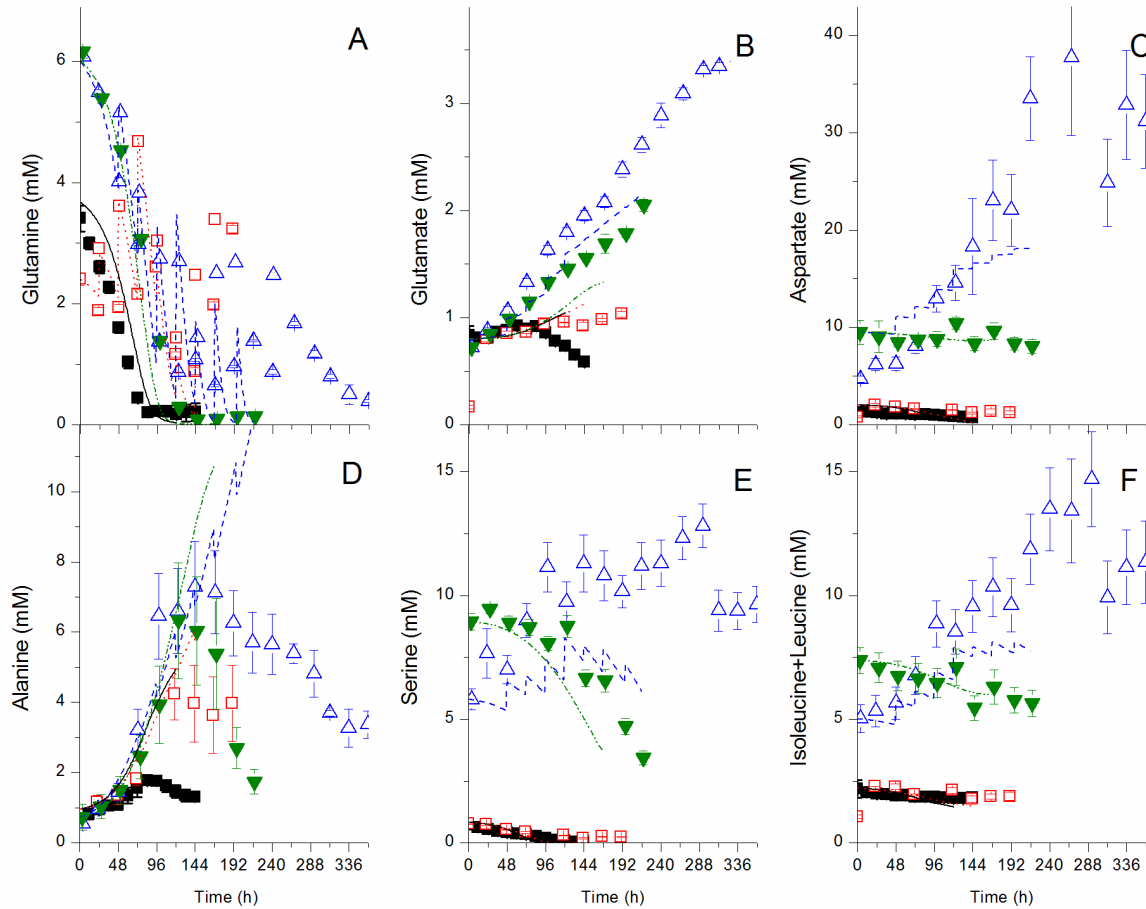


Figure 2.3 Experimental and model simulation results for major extracellular amino acids.

Same conditions and symbols than in Figure 2.2 applied.

2.5.2 Sensitive parameters are of glycolysis regulation, the energetic metabolism and V_{max} 's

The model sensitivity analysis was performed as described in the Material and Methods section, by first considering all four experimental data sets. The parameters for which the mean value of the elementary effect was significantly high (i.e. lower than 0.6) were identified as the most sensitive and were kept for the parameter optimization subsequent steps. The number of parameters was restrained to the most sensitive ones in order to increase the accuracy and the efficiency of the optimization process. Because the optimization method is independent of the experimental error, the output results are independent of the experiment and should be similar for any other culture.

Tableau 2.1: Sensitivity analysis for the selected parameters

Parameters	Mean of the elementary effect	Standard deviation of the elementary effect
$V_{\max\text{growth}}$	4.6	6.9
$V_{\max\text{PK}}$	1.7	4.1
$V_{r\max\text{AK}}$	1.6	3.6
$V_{\max\text{PGK}}$	1.4	3.5
$V_{\max\text{resp}}$	1.4	3.6
$V_{f\max\text{AK}}$	1.3	2.9
$V_{\max\text{HK}}$	1.3	3.3
$V_{\max\text{ATPase}}$	1.2	4.7
$K_{m\text{ATP}}$	1.1	4.0
$K_{m\text{ADP/ATP}}$	1.1	2.6
$K_{m\text{NADH}}$	0.9	3.1
$K_{d\text{NH}_4\text{growth}}$	0.9	3.4
$K_{m\text{G6P}}$	0.9	3.4
$\alpha_{\text{AMP/ATP}}$	0.8	2.5
$V_{f\max\text{GlnT}}$	0.7	3.1
$\beta_{\text{AMP/ATP}}$	0.6	2.5
$V_{\max\text{leak}}$	0.6	1.6
$V_{f\max\text{PGI}}$	0.6	2.1
$K_{a\text{AMP/ATP}}$	0.6	1.7
$K_{d\text{G6P}}$	0.6	1.7

Of the 20 sensitive parameters, 11 are maximal rate constants (V_{\max}) and 4 are affinity constants (K_m), and the remaining parameters are inhibition (2) and activation constants (3). Growth ($V_{\max\text{growth}}$), glutamine metabolism ($V_{\max\text{GlnT}}$), glycolysis ($V_{\max\text{HK}}$, $V_{f\max\text{PGI}}$, $V_{\max\text{PGK}}$ and $V_{\max\text{PK}}$) and energetic metabolism ($V_{\max\text{ATPase}}$, $V_{\max\text{resp}}$, $V_{\max\text{leak}}$, $V_{r\max\text{AK}}$ and $V_{f\max\text{AK}}$) were among sensitive parameters. Interestingly, the pathways with sensitive V_{\max} parameters are among the ones previously identified as sensitive but for another CHO cell lines (Ghorbaniaghdam, Chen, et al.,

2014; Ghorbaniaghdam, et al., 2013). Of the 4 sensitive K_m , 3 are associated to cell energetics with K_{mNADH} and K_{mATP} , respectively involved in NADH and ATP consumption, and $K_{mADP/ATP}$, which affects seven energy-producing reactions. Within the regulation constants, the sensitivity of K_{mG6P} is explained by the fact that glucose-6-phosphate level directly controls the glycolytic influx from a retro-inhibition term, with K_{dG6P} also being a sensitive constant. The value of K_{mG6P} has a direct impact on the glucose-6-phosphate level, which in return affects greatly the glycolytic flux. Finally, sensitivity of $K_{dNH_4growth}$ may be linked to high NH_4 concentration accumulating in the media, which is limiting cell growth. The fact that 3 of those sensitive regulation constants, along with the V_{maxAK} and V_{fmaxAK} , are closely linked to the AMP-to-ATP ratio highlights the crucial role of this regulation pathway on glycolysis. Moreover, the AMP-to-ATP ratio is an efficient regulator of cell metabolism since it varies faster than the ADP-to-ATP ratio (Hardie et al., 2001), and the fact that it affects several glycolytic enzymes explains the sensitivity of the parameters that are linked to this ratio.

Although only V_{max} constants have been identified as sensitive in our previous work with CHO cells (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014; Ghorbaniaghdam, et al., 2013), Nolan & Lee (2011) did also identified as sensitive some regulatory constants from the glycolysis, especially in regards to lactate profile, studying a dynamic model for another CHO cell line. Finally, performing a sensitivity analysis on a dynamic model for plant cells (2008), Mailier et al. (2011) identified the concentration of phosphate, nitrate and sulfur, which acted as regulators, among the most sensitive parameters.

2.5.3 A single set of parameters allows describing cell behaviour for various culture conditions

The model was first calibrated using all four sets of the experimental data obtained in this work, as described in the Material and Methods section. The resulting model was then used to produce simulations of experimental data (Figures. 2.2-2.4 and 2.9-2.11). It was then evaluated if model parameters are culture medium and/or culture mode dependent. Therefore, independent model calibrations were performed on all possible combinations of experimental data subsets. Model parameters were then compared for their confidence regions (Figure. 2.5 presents the differences between the culture mode and the culture medium, see Tableau 2.6 for numerical values with 95 % confidence intervals). There are only few parameters that are significantly differing according

to the data set used for optimization. In fact, there are no differences between the batch and the fed-batch results, while there are only 3 parameters out of 20 being modified comparing the two culture media. V_{maxPGK} is slightly (but significantly) lower in PowerCHO-2, while lower K_{mNADH} and higher $V_{maxresp}$ for the PowerCHO-2 could reveal a higher respiration rate for this medium. The absence of difference between batch and fed-batch cultures is in agreement with another dynamic model describing hybridoma metabolism (Penny Dorka, 2007). In that case, among half-saturation constants for all metabolic reaction rates, only the asparagine half-saturation constant for asparagine consumption differed simulating batch and fed-batch culture data, while 9 maximum reaction rates on 11 were identical, with only the V_{max} for the conversion of glutamate to proline and for the conversion of asparagine to asparatate. The overall performance of the model in the present work suggests that a unique model can be used to adequately simulate different fed-batch strategies on different culture media with a unique set of parameter values, which was not the case when analysing different mAb recombinant CHO clones (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014). Moreover, the calibration of the model parameters on each experimental data set taken separately negatively impacts on the magnitude of the confidence intervals (Figure 2.5), thus reducing the overall model precision. The choice of a model with a single set of parameters thus seems more interesting since, the parameters are more accurate when using a wide array of experimental data, and it allows the model to be used in a more robust way.

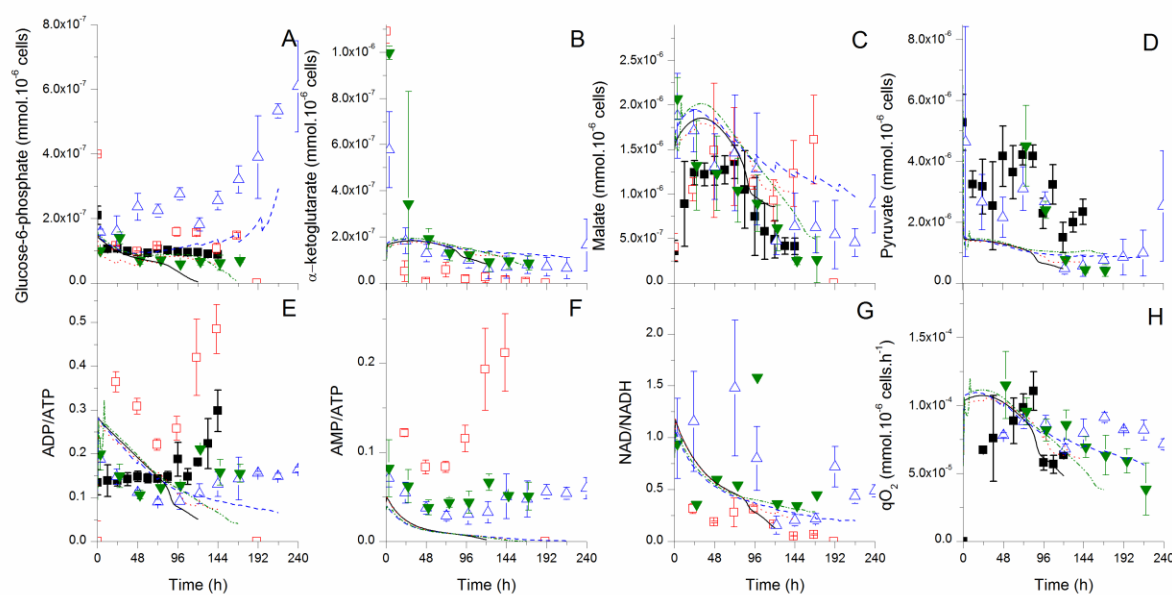


Figure 2.4. Experimental and model simulation results for major intracellular components.

Same conditions and symbols than in Figure 2.2 applied.

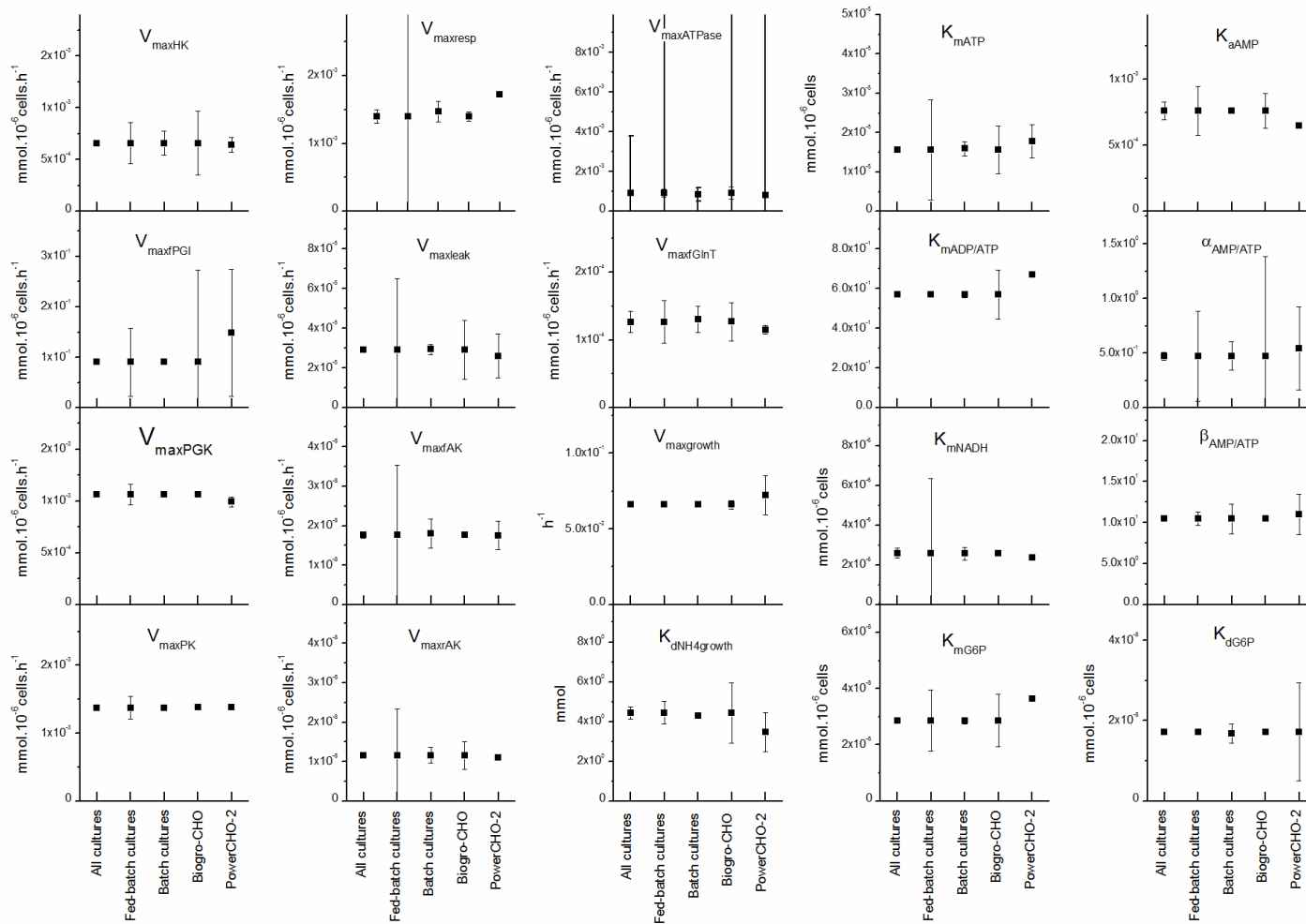


Figure 2.5. Parameters estimates with confidence intervals for different media and culture modes.

The parameter values and their confidence region are compared when using for the optimization: **All** data from all cultures, Data from fed-batch cultures, Data from batch cultures, Data from cultures using Biogro-CHO and Data from cultures using PowerCHO-2.

2.5.4 A single set of parameters allows describing exponential and plateau growth phases

Moving further challenging the model structure performance, we have evaluated the benefit of dividing the model to describe two distinct but successive phases: before (< 72 h) and after (> 72 h) mid-exponential growth phase. This time point approximates the moment where growth and other major fluxes start to decline. Although a fully dynamic model that includes pathway regulation, such as in this work, is thought being able to cope with cell behaviour variation with time, the aim was to evaluate the effect on model simulations accuracy. The idea of dividing the culture into two (Ahn, et al., 2011; P. Dorka, et al., 2009; Gao, et al., 2007), three (Provost, et al., 2006) or four (Templeton, et al., 2013) distinct culture phases has also been proposed to model mammalian cells behaviour. Indeed in these works, metabolic flux analysis (MFA) studies have revealed significant differences of flux levels and distribution at different stages of a culture, under quasi-steady state condition however. In the present work, the confidence regions overlap (confidence intervals (95 %) in Figure 2.6, and numerical values in Tableau 2.7) for all except for two parameters comparing before and after 72 h. The estimated value of K_{mG6P} is slightly lower after 72 h ($2.6 \cdot 10^{-8}$ mmol. 10^{-6} cells versus $2.9 \cdot 10^{-8}$ mmol. 10^{-6} cells), which could indicate a higher glycolytic flux or the limitation of glucose-6-phosphate depletion, and the value of K_{aAMP} is higher (0.11 versus 0.09), which may reveal a decrease of glycolytic activity and lactate production at the mid-exponential phase. Overall, although simulation error can be lower when changing the value of these two parameters, the structure of the model also shows possible describing the whole culture behaviour from inoculation to the decline phase with a unique set of parameter values. However, since the model does not describe cell viability, and considering that the metabolomic data remain reliable at high cell viability, it was decided to limit the further evaluation of the model to the data sets with cell viability level of 95 % and above. The decline phase is thus not described.

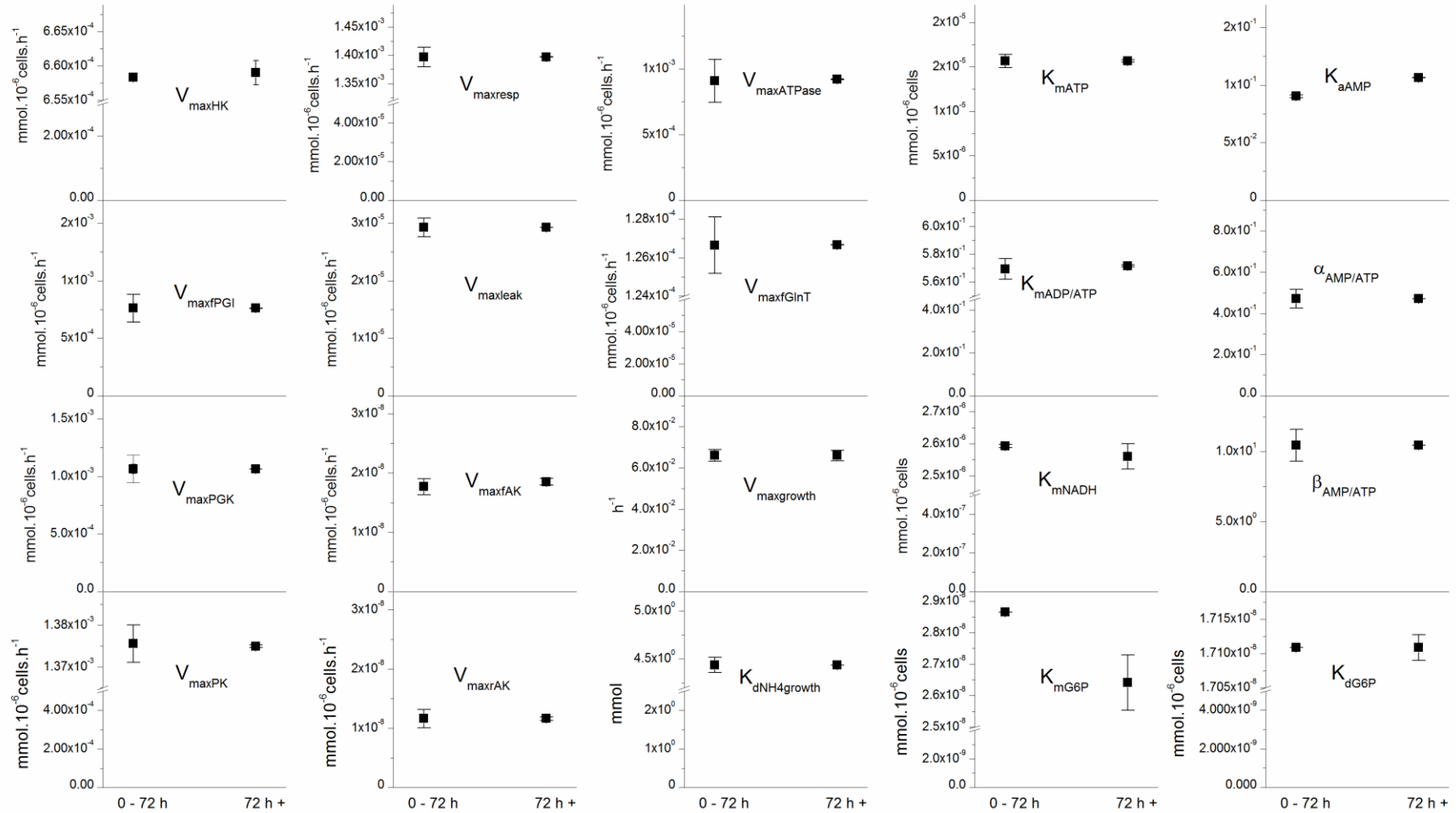


Figure 2.6. Parameters estimates with confidence intervals for different growth phases.

Parameter value (black square) and confidence region when using data before the mid-exponential growth phase at 72 h or after the mid-exponential growth phase for optimization.

Therefore, a unique model structure with a unique set of parameter values has been used to simulate each culture (Figures. 2.2-2.4). The simulations are in general close to the experimental data. The model simulates adequately the cell (Figure 2.2A) and mAb (Figure 2.2C) concentrations with time for the two media. Glucose (Figure 2.2D) and glutamine (Figure 2.3A) profiles match the experimental data for batch cultures, while the model somewhat overestimates the glucose profile for the fed-batch culture using PowerCHO-2 but underestimates the glutamine level for both fed-batch cultures. It should be reminded that the only model inputs are the parameter values, the initial conditions and the feed volume and composition. Since glucose and glutamine are fed in greater quantities, the deviations could be explained by the cumulative error at each feed.

The model also simulates cell respiration rate (Figure 2.4H) and related TCA metabolites such as malate (Figure 2.4C) and NAD/NADH ratio (Figure 2.4G). The accumulation of glucose-6-phosphate in the fed-batch culture using PowerCHO-2 is also accurately simulated (Figure 2.4A). The AMP/ATP ratio is however somehow underestimated by the model (Figure 2.4F), but it follows the general trend of experimental data except for the fed-batch culture using the Biogro-CHO medium. The metabolic shift from alanine production to alanine consumption (Figure 2.3D) is not as pronounced with the simulations compared to experimental data. The initial underestimation of pyruvate concentration (Figure 2.4C) might be related to the overestimation of the direct V_{AlaTA} flux in the latter stages of the culture, since the pyruvate concentration stays constant in the simulations as compared to experimental data. Also, in the model, the V_{AlaTA} reverse reaction is inhibited by extracellular glutamine, while the shift seems closely related to glutamine depletion, suggesting that the chosen mechanism might not be optimal. Moreover, the uptake rate for some amino acids seems to be overestimated (e.g. tyrosine and valine, Figure 2.10A and B respectively) or underestimated (e.g. asparagine, Figure 2.10E) for some others. A strategy to enhance the simulation fit for these compounds would consist in optimizing their respective uptake rates by optimizing cell and mAb composition (i.e. stoichiometry); understanding that the cell and mAb compositions can differ from proposed values in literature (Quek, et al., 2010; Sheikh, et al., 2005). Moreover, this could also contribute improving simulation of the pentose phosphate pathway components (xylose-5-phosphate shown in Figure 2.11D), which are currently overestimated by the model. Since ribulose-5-phosphate is

consumed for biomass synthesis, this pathway is highly sensible to growth rate and thus to the cell content in nucleotide precursors.

2.5.5 Fed-batch culture mode enables maintaining cell metabolic activity

The model, which showed being efficient at describing cell behaviour for the four culture conditions assessed, was then used as an *in silico* platform to perform a dynamic MFA study extracting tedious to impossible to obtain data from the same cultures. Major fluxes (Figure 2.7) at all time points for all four cultures, as well as the numerical results with 95 % confidence intervals at 48 h (mid-exponential growth phase) and 96 h (plateau growth phase) (Tableaux 2.8 and 2.9) are shown. Simulated metabolic fluxes are in agreement with literature on CHO cells. Glucose consumption rate (V_{HK}) was similar to that for lactate consumption (V_{LDH}) rate ($\sim 2 \times 10^{-4}$ mmol. 10^{-6} cells.h $^{-1}$ after 48 h), a value range that is consistent with literature with $[1 - 2] \times 10^{-4}$ mmol glucose. 10^{-6} cells.h $^{-1}$ and $[1 - 3] \times 10^{-4}$ mmol lactate. 10^{-6} cells.h $^{-1}$ at exponential phase (Ahn, et al., 2011; Provost, et al., 2006; Templeton, et al., 2013). The pyruvate dehydrogenase flux, which connects glycolysis and TCA cycle shows a low value range of 1.6 ± 0.2 to $1.7 \pm 0.2 \times 10^{-5}$ mmol. 10^{-6} cells.h $^{-1}$ that is close to that reported by Templeton et al. (2013) of 2.71×10^{-5} , while an higher value (13.5×10^{-5} mmol. 10^{-6} cells.h $^{-1}$) has been reported by Ahn & Antoniewicz (2011) at exponential phase. The pentose phosphate pathway flux value ($3.4 \pm 0.3 - 3.7 \pm 0.3 \times 10^{-6}$ mmol. 10^{-6} cells.h $^{-1}$ at 48 h) is similar to values reported for the exponential phase with 1.8 ± 0.2 mmol. 10^{-6} cells.h $^{-1}$ (Ahn, et al., 2011) and for the early exponential phase 1.25×10^{-6} cells.h $^{-1}$ (Templeton, et al., 2013).

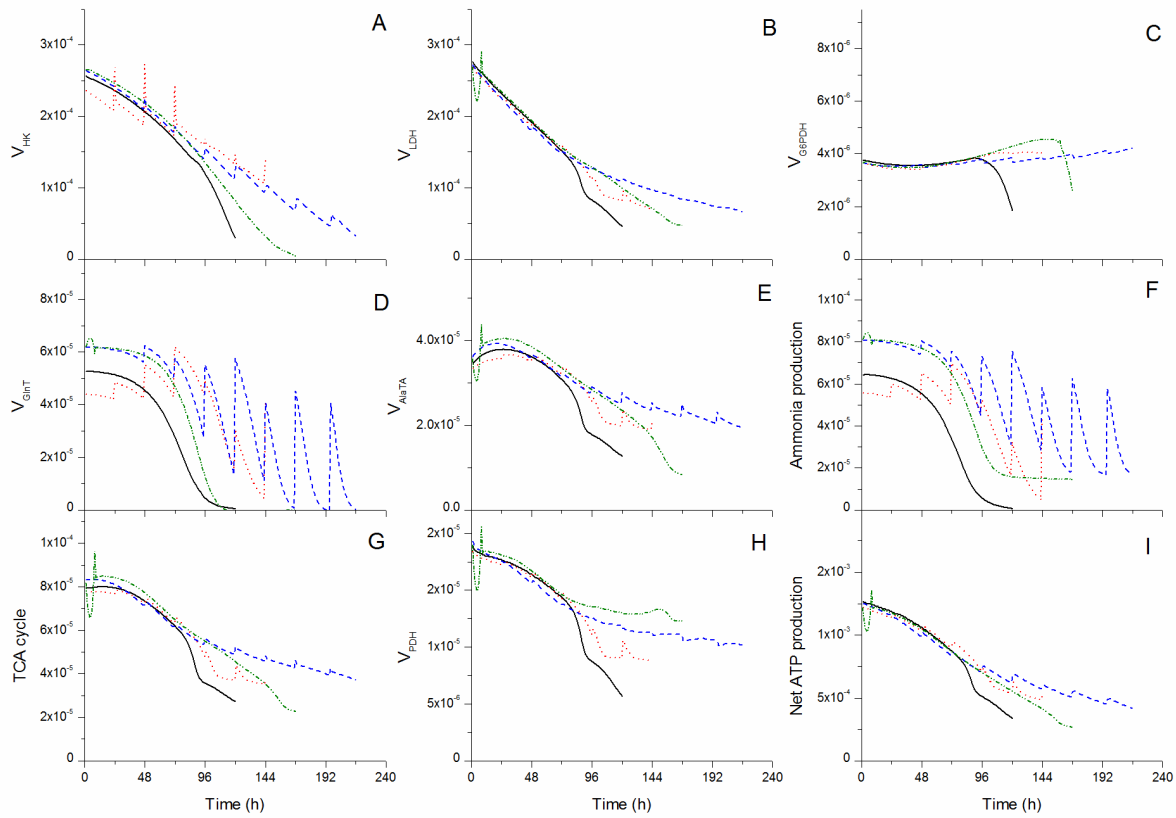


Figure 2.7. Model simulation of metabolic fluxes.

Metabolic fluxes (all in $\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$) were simulated for the same conditions as in Figure 2.2-2.4 for batch cultures using Biogro-CHO (straight line - black) and PowerCHO-2 (dashed and dotted line - green), and fed-batch cultures using Biogro-CHO (dotted line - red) and PowerCHO-2 (dashed line - blue). Ammonia production (Figure 2.7F) is defined as $V_{GLDH} + V_{GlnT} + V_{SDHH} + V_{ASN} + V_{HISARGTA}$, and TCA cycle flux (Figure 2.7G) is defined as the sum of the reactions entering in $(V_{GLDH} + V_{PDH} + V_{AlaTA} + V_{PC} + 5 \cdot V_{AAtoSUC})$, and finally the net ATP production flux (Fig. 2.7I) consists in the sum of the ATP-producing metabolic fluxes $(V_{PGK} + V_{PK} + V_{AKGDH} + V_{PC} + V_{GlnT} + 2 \cdot 2.5 \cdot V_{resp})$.

There are very few differences in the flux levels for the first 72 h of the culture when the four cases are compared. At 48 h, the glutamine consumption rate (V_{GlnT}) is significantly lower for the batch culture using Biogro-CHO than for the fed-batch culture using PowerCHO-2. Ammonia production rate ($V_{GLDH} + V_{GlnT} + V_{SDHH} + V_{ASN} + V_{HISARGTA}$) seems lower for Biogro-CHO compared to PowerCHO-2, although the difference is only significant when comparing the batch mode with

that medium to other cultures. This result was expected since Biogro-CHO medium contains significantly less glutamine at inoculation (and after 48 h), thus limiting V_{GlnT} and indirectly ammonia production.

Although all metabolic fluxes show a decreasing trend whatever the culture conditions from 48-96 h, significant differences of behaviour raised in the latter culture stages comparing flux levels among cultures. This flux decrease was noticeable for glucose consumption (V_{HK} , Figure 2.7A), lactate production (V_{LDH} , Figure 2.7B), glutamine consumption (V_{GlnT} , Figure 2.7D), alanine production (V_{AlaTA} , Figure 2.7E), the global TCA cycle activity (Figure 2.7G, defined as the sum of the fluxes that enter the TCA cycle or $V_{GLDH}+V_{PDH}+V_{AlaTA}+V_{PC}+5*V_{AAtoSUC}$), and for the net ATP production rate (Figure 2.7I, defined as the sum of all ATP-producing fluxes or $V_{PGK} + V_{PK} + V_{AKGDH} + V_{PC} + V_{GlnT} + 2*2.5*V_{resp}$). In the case of V_{HK} and V_{LDH} , the only significant difference after 96 h is observed between the batch culture using Biogro-CHO and the other cultures, a result that may be due to a faster glucose depletion in the former case. However, both the glutamine consumption rate and the ammonia production rate show maintaining their activity levels in the two fed-batch cultures. This result indicates that the feed strategy was able to maintain glutamine metabolism towards the TCA cycle and to limit glutamine depletion. Unlike glutaminolysis, glycolysis is not maintained at the same activity level in fed-batch cultures even if glucose was not limiting. This could be due to the inhibition effect of lactate and alanine on phosphofructokinase (V_{PFK} , Tableau 2.3 Eq. no 3) and pyruvate kinase (V_{PK} , Tableau 2.3 Eq. no 5) respectively. The value of the inhibition term of lactate on glycolysis under fed-batch conditions decreased from 0.89 initially to 0.29 after 96 h, while the effect of alanine is much smaller (0.96 to 0.86), thus decreasing phosphofructokinase less than lactate. Lactate accumulation is thus thought causing a significant inhibition phenomenon in fed-batch. The dynamic structure of the model as well as the inclusion of the main mechanisms involved in glycolysis regulations result in a robust but reactive biosystem; the decreasing of a single flux can affect all the other glycolytic fluxes, including glucose consumption (V_{HK}) and lactate production rates. The pentose phosphate pathway global activity (V_{G6PDH} , Figure 2.7C), however, remains constant throughout the culture unlike glycolysis to which it is intimately related. Interestingly, the pyruvate dehydrogenase activity level (V_{PDH} , Figure 2.7G) shows being linked to the medium composition rather than to the culture mode. Indeed, the values in Biogro-CHO after 96 h ($0.75\pm0.13 \cdot 10^{-5} \text{ mmol}\cdot 10^{-6}\text{cells}\cdot\text{h}^{-1}$ for batch culture, $0.75\pm0.19 \cdot 10^{-5} \text{ mmol}\cdot 10^{-6}\text{cells}\cdot\text{h}^{-1}$ for the

fed-batch culture) are significantly lower than the ones for PowerCHO-2 ($1.36 \pm 0.17 \cdot 10^{-5}$ mmol. 10^{-6} cells.h $^{-1}$ for batch culture, $1.26 \pm 0.15 \cdot 10^{-5}$ mmol. 10^{-6} cells.h $^{-1}$ for the fed-batch culture). Since V_{PDH} activity relies on the intracellular concentration of pyruvate and on the NAD/NADH ratio in our model, it may be affected indirectly by the culture medium composition in the latter culture stages from extracellular metabolites concentrations. However, further investigations are required to clearly understand the cause of this difference of behaviour.

2.5.6 Fed-batch culture condition enhances the stability of metabolic flux ratios

To further investigate the behaviour of the cells looking at biological markers, the carbon flow distribution through the metabolic network was also analysed by model simulations (Figure 2.8 for key metabolic ratios, and Tableau 2.10 for numerical values and 95 % confidence intervals at 48 and 96 h). Similarly than for most fluxes (Figure 2.7), flux ratios are closely similar for all culture conditions until 96 h, which corresponds to late exponential phase in batch and mid-exponential in early fed-batch operation. Then, the behaviours differ for the two batches, with PowerCHO-2, while all flux ratios exhibit quasi steady-states with similar values in both fed-batch cultures. Interestingly, PowerCHO-2 batch shows opposite behaviour of that in Biogro-CHO medium from 96 h. We recall the Biogro-CHO batch reached maximum cell density at ~ 96 h and at ~ 120 h in PowerCHO-2 batch, while cell growth extended to 168 h in both fed-batches (Figure 4B). Indeed, from 96 h in the PowerCHO-2 batch culture the ratio of pyruvate dehydrogenase (V_{PDH}) -to-glycolytic flux (V_{PK}) and the V_{PDH} contribution to the TCA cycle both suddenly increase until the end of the culture (Figure 2.8, B and D respectively), while amino acids flux to the TCA cycle suddenly decreases (Figure 2.8E). These punctual metabolic shifts coincide with glutamine depletion observed in this PowerCHO-2 batch culture. Of interest, the lactate production-to-glucose consumption rates ratio (V_{LDH}/V_{PK} , Figure 2.8A) exhibits an enhanced stability, also in that culture compared to the batch Biogro-CHO culture. Moreover, the simulated ATP turnover rate, either in glycolysis ($V_{HK}+V_{PFK}$, Figure 2.8C) or from the oxidative phosphorylation (V_{resp} , Figure 2.8F), shows a higher stability in the PowerCHO-2 batch culture. The effect of re-feeding essential medium components in fed-batch cultures clearly show stabilizing the cell metabolic efficiency for all flux ratios analysed (Figure 2.8), exhibiting steady-state trend for the whole culture duration regardless of the use of the Biogro-CHO or

PowerCHO-2 media. Therefore, although each individual flux shows to evolve with culture time (Figure 2.7), the cell metabolic robustness at maintaining stable carbon flux distribution seems enhanced, including the ATP turnover rate which determines a cell global efficiency. We have previously showed that such stable cell energetic state also determines cell productive capacity (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014); thus agreeing with the model predictions of similar production capacity in all the cases under study. Specifically, the specific growth rates and mAb production rates are adequately simulated.

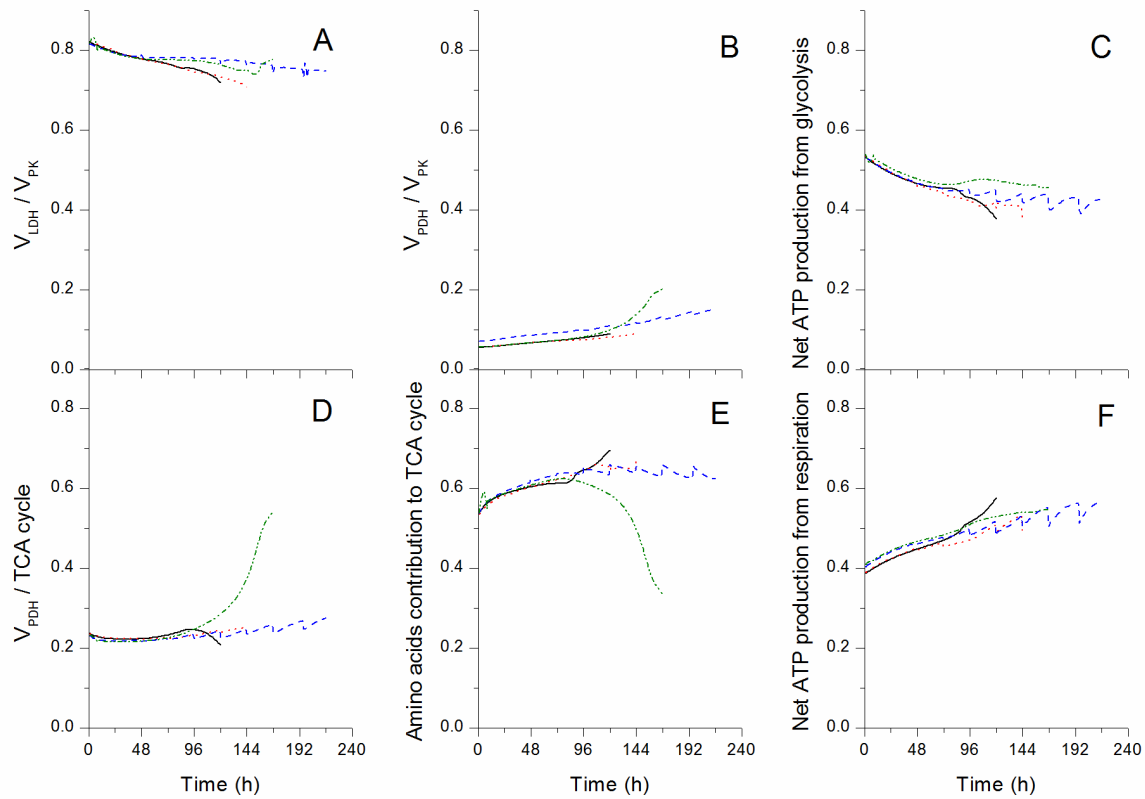


Figure 2.8. Model simulations of the metabolic ratios.

Metabolic fluxes were simulated for the same conditions than in Figure 2.2. Formulation of TCA cycle flux and net ATP production are the same as in Figure 2.7. Amino acids contribution to the TCA cycle is the ratio of the sum of the fluxes from amino acids feeding the TCA cycle ($V_{GLDH} + V_{AlaTA} + 5 * V_{AAtoSUC}$) to the sum of all the fluxes feeding the TCA cycle, as defined in Figure 2.7. The net ATP production from glycolysis is the ratio of the sum of the ATP-producing rate from glycolysis ($V_{HK} + V_{PFK}$) and the net ATP production rate. The net ATP production from

respiration is the ratio of $2 \cdot 2.5 \cdot V_{\text{resp}}$ (or 2 moles equivalent of NADH) to the net ATP production rate.

Our results show a robust metabolism for this cell line, when in batch mode, with little differences in the flux distribution even at the end of the exponential phase. Similar results in regards to this flux distribution was observed by Naderi et al. (2011) concerning the absence of differences between exponential and stationary phases for viable cells in batch cultures. In contrast, some reports indicate that stationary phase exhibits lower glycolytic fluxes coupled with a TCA activity similar to (Ahn, et al., 2011) or greater (Templeton, et al., 2013) than the TCA cycle activity measured during the exponential phase. In our model, however, simulations were stopped rapidly in the stationary phase because of the criteria of 95 % cell viability we imposed. Those results might have been observed if the model structure would have allowed extending the simulation further at low cell viability.

When comparing batch and fed-batch-modes, model simulations are in agreement with previous work of Dorka et al. (2009) for hybridoma cells who also used a dynamic model to compare culture modes showing a similar flux distribution for both modes. However, other work performing a MFA study on NSO cells (Mulukutla et al., 2012) showed a significantly different flux distribution comparing fed-batch to batch mode. Authors reported that either the flux distribution and the flux ratios changed when the cells switched from a lactate production mode to a lactate consumption mode, a phenomenon that has not been clearly observed neither experimentally nor from model simulations in this work and which may explain a different conclusion in our work compared to Mulukutla et al. (2012). Taking all of the above, this *in silico* dynamic metabolic flux distribution analysis thus suggests that the CHO cell line studied has a highly regulated metabolism.

2.5.7 Amino acids metabolism limits growth in the latter phases of the culture

The CHO cells under study exhibit an inefficient glucose metabolism with more than 75 % of glycolysis resulting in lactate production, which leads to lactate accumulation and thus growth inhibition (< 58.5 mM lactate (Z. Z. Xing et al., 2008)). Around only 7 % of the glycolytic flux is directed toward the TCA cycle via the pyruvate dehydrogenase (V_{PDH}) enzyme, and the rest of the glycolytic flux is being split amongst alanine production (V_{AlaTA}) (~10 %) and pyruvate

carboxylase (V_{PC}) (less than 5 %). The inefficient use of glucose for ATP production is a well-known characteristic of CHO cells (Mulukutla, et al., 2010), converting most of the available glucose into lactate obtaining ATP from an aerobic glycolysis process. Glycolysis normally accounts for roughly 45 % of the net ATP production, cell respiration being responsible for the remaining production.

Since most of medium glucose is not processed via the V_{PDH} enzyme, the TCA cycle is largely fed from the amino acids metabolism ($V_{AlaTA} + V_{GLDH} + 5 * V_{AAtoSUC}$), indeed accounting for 60 ± 1 to 62 ± 1 % after 48 h depending on the culture, compared to only 22 ± 1 % for the pyruvate dehydrogenase. The major contribution of glutamine and asparagine to TCA feeding in CHO cells was reported previously (Dean, et al., 2013). Surprisingly in our case, the glutamate dehydrogenase flux (V_{GLDH}) was negligible; most of the glutamate integrating the TCA cycle via alanine tranferase (V_{AlaTA}). Unlike V_{GLDH} , V_{AlaTA} pathway does not produce directly ammonia, a metabolite known to inhibit cell growth and viability and affect glycosylation patterns (Butler, 2005). However, the cells do not consume extracellular glutamate, and the conversion of glutamine to glutamate via V_{GlnT} , of asparagine to aspartate via V_{ASN} which can be further transformed to glutamate via aspartate transferase, produce ammonia as a by-product. While the cells manage to maintain an efficient amino acids metabolism in regards to ammonia secretion, the use of amino acids to fuel the TCA cycle still produces undesired metabolites compared to the use of glycolysis. In our case for fed-batch culture, the inhibition term in the growth equation in regards to lactate went from 0.99 initially to 0.89 for the fed-batch culture using Biogro-CHO, and from 0.99 initially to 0.86 for the fed-batch culture using PowerCHO-2. For the ammonia however, the value of the inhibition term in the growth equation changed from 0.957 in both fed-batch cultures initially to 0.372 for the fed-batch culture using Biogro-CHO, and 0.278 for the fed-batch culture using PowerCHO-2 after 120 h. The accumulation of ammonia, more than the accumulation of lactate, may explain the slow growth observed in the latter stages for both fed-batch cultures, and the absence of improvement of the mAb final titer compared to the batch cultures regardless of the culture medium used. Moreover, the inhibition factor linking growth rate and ammonia concentration was previously identified (see Tableau 2.1) as a sensitive parameter, highlighting the negative effect of ammonia.

2.6 Conclusion

In this work, we have further developed, accounting for the regulation of glycolysis, and adapted a kinetic metabolic model previously described for other CHO cell lines. The model was challenged with experimental data from two different culture media used in batch and fed-batch cultures. In such model, the initial conditions and the feed composition are the only inputs required to perform culture simulations. A single set of kinetic parameter values allowed describing CHO cell nutritional and metabolic behaviours under batch and fed-batch cultures using two different culture media (Biogro-CHO and PowerCHO-2). Moreover, given the dynamic nature of the model, we performed a dynamic metabolic flux analysis from model simulation that was in agreement with literature. Model simulations suggest that the cell line used in this study (CHO-DXB11) has a robust metabolism, showing little changes in terms of flux distribution throughout nearly all of the exponential and plateau phase. That metabolism was maintained regardless of the medium or the culture mode used for most of the culture duration. The fed-batch mode was somehow able to maintain that stable metabolism for an extended period of time. However, sustained amino acids metabolism in fed-batch cultures led to important ammonia accumulation, which limited growth but resulted in higher mAb production in the fed-batch mode. We thus believe such model can be used as an *in silico* platform and be further challenged for the identification of optimized medium composition and fed-batch culture strategies, guiding and accelerating bioprocess development step.

2.7 Acknowledgment

The authors would like to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Monoclonal Antibody Network (MabNet) for their funding and their support for this work, and Dr. Yves Durocher who kindly transfer the recombinant CHO-DXB11 cell line producing the EG2-hFc monoclonal antibody used in this work.

2.8 References

- Agrawal, V., Slivac, I., Perret, S., Bisson, L., St-Laurent, G., Murad, Y., et al. (2012). Stable Expression of Chimeric Heavy Chain Antibodies in CHO Cells. In D. Saerens & S. Muyldermans (Eds.), *Single Domain Antibodies* (Vol. 911, pp. 287-303): Humana Press.

- Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic Engineering*, 13(5), 598-609.
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry 5th edition*: W H freeman.
- Butler, M. (2005). Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. [Review]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(3), 283-291.
- Castro, P. M., Hayter, P. M., Ison, A. P., & Bull, A. T. (1992). Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 84-90.
- Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C., & Gek Sim Yap, M. (2005). Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(2), 164-177.
- Cloutier, M., Bouchard-Marchand, E., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2008). A predictive nutritional model for plant cells and hairy roots. *Biotechnol Bioeng*, 99(1), 189-200.
- Cloutier, M., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2007). Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism. [Article]. *Phytochemistry*, 68(16-18), 2393-2404.
- Dash, R. K., Li, Y. J., Kim, J., Saidel, G. M., & Cabrera, M. E. (2008). Modeling cellular metabolism and energetics in skeletal muscle: Large-scale parameter estimation and sensitivity analysis. *Ieee Transactions on Biomedical Engineering*, 55(4), 1298-1318.
- Dean, J., & Reddy, P. (2013). Metabolic analysis of antibody producing CHO cells in fed-batch production. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(6), 1735-1747.
- Dorka, P. (2007). *Modelling batch and fed-batch mammalian cell cultures for optimizing MAb productivity*. Unpublished M.A.Sc., University of Waterloo (Canada), Ann Arbor.
- Dorka, P., Fischer, C., Budman, H., & Scharer, J. (2009). Metabolic flux-based modeling of mAb production during batch and fed-batch operations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(2), 183-196.

- Europa, A. F., Gambhir, A., Fu, P. C., & Hu, W. S. (2000). Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(1), 25-34.
- Gao, J. Y., Gorenflo, V. M., Scharer, J. M., & Budman, H. M. (2007). Dynamic metabolic modeling for a MAB bioprocess. [Article]. *Biotechnology Progress*, 23(1), 168-181.
- Ghorbaniaghdam, A., Chen, J., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). Analyzing Clonal Variation of Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell Lines Using an In Silico Metabolomic Platform. *Plos One*, 9(3).
- Ghorbaniaghdam, A., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2013). A kinetic-metabolic model based on cell energetic state: study of CHO cell behavior under Na-butyrate stimulation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(4), 469-487.
- Ghorbaniaghdam, A., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). An in-silico study of the regulation of CHO cells glycolysis. *Journal of Theoretical Biology*, 357(0), 112-122.
- Goudar, C., Biener, R., Boisart, C., Heidemann, R., Piret, J., de Graaf, A., et al. (2010). Metabolic flux analysis of CHO cells in perfusion culture by metabolite balancing and 2D C-13, H-1 COSY NMR spectroscopy. *Metabolic Engineering*, 12(2), 138-149.
- Hacker, D. L., De Jesus, M., & Wurm, F. M. (2009). 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells — Where do we go from here? *Biotechnology Advances*, 27(6), 1023-1027.
- Hardie, D. G., & Hawley, S. A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays*, 23(12), 1112-1119.
- Herwig, C., & von Stockar, U. (2002). A small metabolic flux model to identify transient metabolic regulations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24(6), 395-403.
- Kim, J. Y., Kim, Y. G., & Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 917-930.

- Leite, T. C., Coelho, R. G., Da Silva, D., Coelho, W. S., Marinho-Carvalho, M. M., & Solapenna, M. (2011). Lactate downregulates the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase in diverse tissues from mice. *Febs Letters*, 585(1), 92-98.
- Lequeux, G., Beauprez, J., Maertens, J., Van Horen, E., Soetaert, W., Vandamme, E., et al. (2010). Dynamic metabolic flux analysis demonstrated on cultures where the limiting substrate is changed from carbon to nitrogen and vice versa. *BioMed Research International*, 2010.
- Llorente, P., Marco, R., & Sols, A. (1970). Regulation of liver pyruvate kinase and the phosphoenolpyruvate crossroads. *European Journal of Biochemistry*, 13(1), 45-54.
- Mahadevan, R., Edwards, J. S., & Doyle, F. J. (2002). Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli*. *Biophysical Journal*, 83(3), 1331-1340.
- Mailier, J., Delmotte, A., Cloutier, M., Jolicoeur, M., & Vande Wouwer, A. (2011). Parametric sensitivity analysis and reduction of a detailed nutritional model of plant cell cultures. *Biotechnol Bioeng*, 108(5), 1108-1118.
- Martínez, V. S., Dietmair, S., Quek, L.-E., Hodson, M. P., Gray, P., & Nielsen, L. K. (2013). Flux balance analysis of CHO cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(2), 660-666.
- Morris, M. D. (1991). Factorial sampling plans for preliminary computational experiments. *Technometrics*, 33(2), 161-174.
- Mulukutla, B. C., Gramer, M., & Hu, W.-S. (2012). On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells. *Metabolic Engineering*, 14(2), 138-149.
- Mulukutla, B. C., Khan, S., Lange, A., & Hu, W.-S. (2010). Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends in Biotechnology*, 28(9), 476-484.
- Naderi, S., Meshram, M., Wei, C., McConkey, B., Ingalls, B., Budman, H., et al. (2011). Development of a mathematical model for evaluating the dynamics of normal and apoptotic Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Progress*, 27(5), 1197-1205.

- Nolan, R. P., & Lee, K. (2011). Dynamic model of CHO cell metabolism. *Metabolic Engineering*, 13(1), 108-124.
- Nyberg, G. B., Balcarcel, R. R., Follstad, B. D., Stephanopoulos, G., & Wang, D. I. C. (1999). Metabolism of peptide amino acids by Chinese hamster ovary cells grown in a complex medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(3), 324-335.
- Parampalli, A., Eskridge, K., Smith, L., Meagher, M., Mowry, M., & Subramanian, A. (2007). Developement of serum-free media in CHO-DG44 cells using a central composite statistical design. *Cytotechnology*, 54(1), 57-68.
- Poliquin, P. O., Chen, J., Cloutier, M., Trudeau, L.-É., & Jolicoeur, M. (2013). Metabolomics and In-Silico Analysis Reveal Critical Energy Deregulations in Animal Models of Parkinson's Disease. *Plos One*, 8(7), e69146.
- Provost, A., & Bastin, G. (2004). Dynamic metabolic modelling under the balanced growth condition. *Journal of Process Control*, 14(7), 717-728.
- Provost, A., Bastin, G., Agathos, S. N., & Schneider, Y. J. (2006). Metabolic design of macroscopic bioreaction models: application to Chinese hamster ovary cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29(5-6), 349-366.
- Quek, L.-E., Dietmair, S., Krömer, J. O., & Nielsen, L. K. (2010). Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metabolic Engineering*, 12(2), 161-171.
- Sandadi, S., Ensari, S., & Kearns, B. (2006). Application of Fractional Factorial Designs to Screen Active Factors for Antibody Production by Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology Progress*, 22(2), 595-600.
- Segel, I. H. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systemes*: John Wiley & Sons.
- Selvarasu, S., Ho, Y. S., Chong, W. P. K., Wong, N. S. C., Yusufi, F. N. K., Lee, Y. Y., et al. (2012). Combined in silico modeling and metabolomics analysis to characterize fed-batch CHO cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(6), 1415-1429.

- Sen, S., & Roychoudhury, P. K. (2013). Development of optimal medium for production of commercially important monoclonal antibody 520C9 by hybridoma cell. *Cytotechnology*, 65(2), 233-252.
- Sengupta, N., Rose, S. T., & Morgan, J. A. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cell metabolism in the late non-growth phase. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(1), 82-92.
- Sheikh, K., Forster, J., & Nielsen, L. K. (2005). Modeling hybridoma cell metabolism using a generic genome-scale metabolic model of *Mus musculus*. *Biotechnol Prog*, 21(1), 112-121.
- Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., & Henry, O. (2013). Probing the metabolism of an inducible mammalian expression system using extracellular isotopomer analysis. [Article]. *Journal of Biotechnology*, 164(4), 469-478.
- Sin, G., Gernaey, K. V., & Lantz, A. E. (2009). Good modeling practice for PAT applications: propagation of input uncertainty and sensitivity analysis. *Biotechnol Prog*, 25(4), 1043-1053.
- Templeton, N., Dean, J., Reddy, P., & Young, J. D. (2013). Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(7), 2013-+.
- Valancin, A., Srinivasan, B., Rivoal, J., & Jolicoeur, M. (2013). Analyzing the effect of decreasing cytosolic triosephosphate isomerase on *Solanum tuberosum* hairy root cells using a kinetic–metabolic model. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(3), 924-935.
- Xie, L., & Wang, D. I. (1994). Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor. *Cytotechnology*, 15(1-3), 17-29.
- Xing, Z. Z., Bishop, N., Leister, K., & Li, Z. J. (2010). Modeling Kinetics of a Large-Scale Fed-Batch CHO Cell Culture by Markov Chain Monte Carlo Method. *Biotechnology Progress*, 26(1), 208-219.
- Xing, Z. Z., Li, Z. J., Chow, V., & Lee, S. S. (2008). Identifying inhibitory threshold values of repressing metabolites in CHO cell culture using multivariate analysis methods. *Biotechnology Progress*, 24(3), 675-683.

Zhang, H., Wang, H., Liu, M., Zhang, T., Zhang, J., Wang, X., et al. (2013). Rational development of a serum-free medium and fed-batch process for a GS-CHO cell line expressing recombinant antibody. *Cytotechnology*, 65(3), 363-378.

2.9 Supporting information

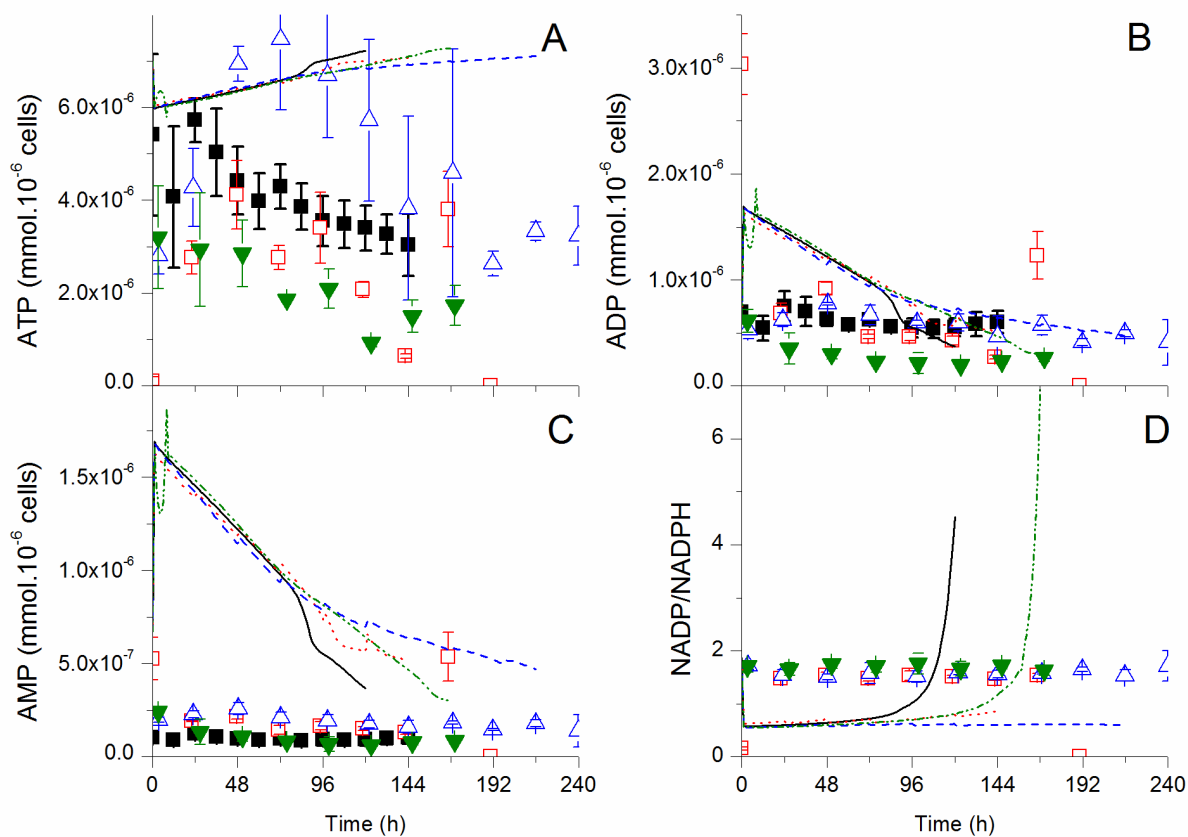


Figure 2.9. Experimental and model simulation results for intracellular nucleotides.

Same conditions and symbols than in Figure 2.2 applied

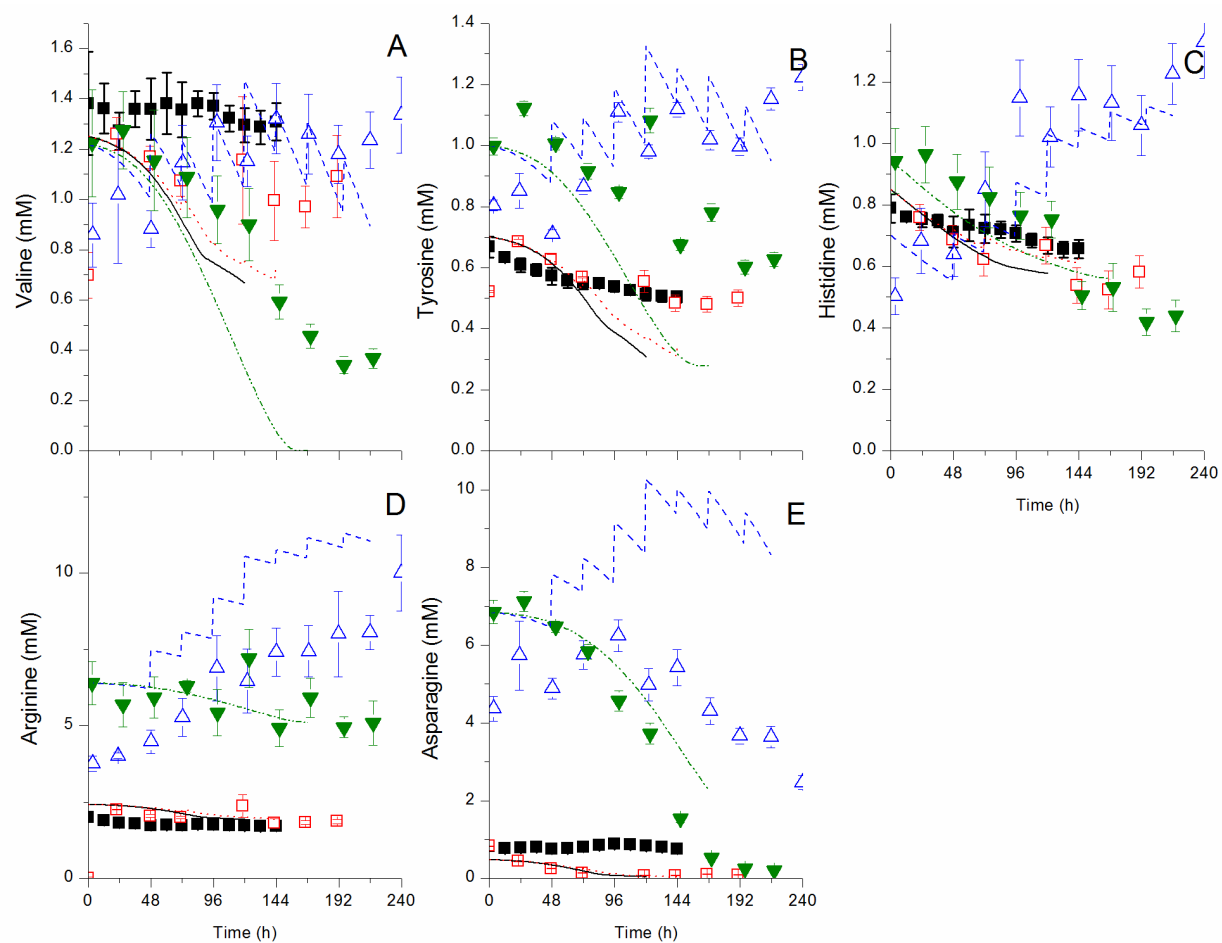


Figure 2.10. Experimental and model simulation results for intracellular metabolites

Same conditions and symbols than in Figure 2.2 applied

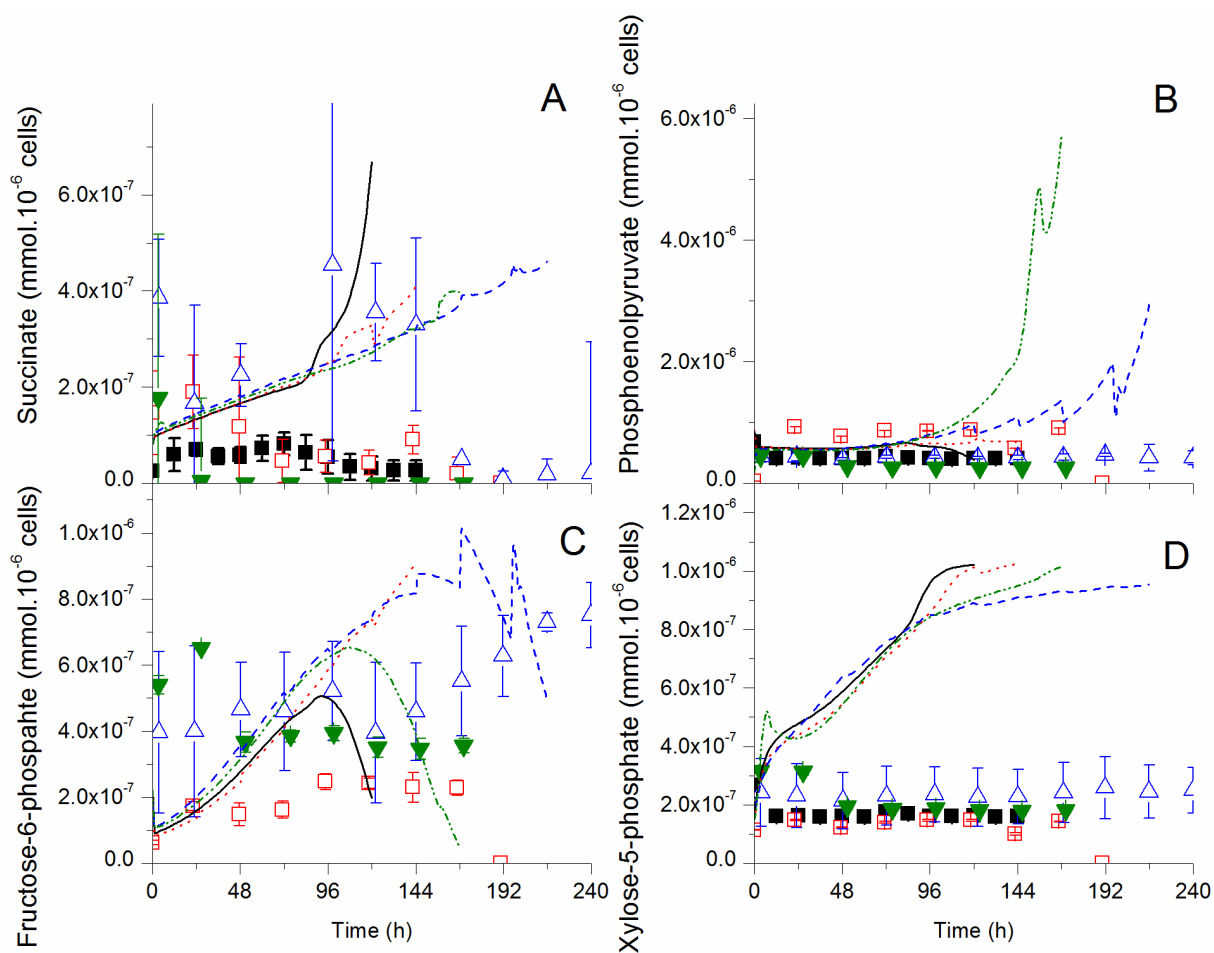


Figure 2.11. Experimental and model simulation results for extracellular amino acid

Same conditions and symbols than in Figure 2.2 applied

Tableau 2.2: Reactions of the metabolic model

No	Name	Abbreviation	Stoichiometry
1	Hexokinase	V_{HK}	$EGLC + ATP \longrightarrow G6P + ADP$
2	Phosphoglucose isomerase	V_{PGI}	$G6P \longleftrightarrow F6P$
3	Phosphofructokinase	V_{PFK}	$F6P + ATP \longrightarrow 2GAP + ADP$
4	Phosphoglycerate kinase	V_{PGK}	$GAP + ADP + NAD^+ \longrightarrow PEP + ATP + NADH$
5	Pyruvate kinase	V_{PK}	$PEP + ADP \longrightarrow PYR + ATP$
6	Lactate dehydrogenase	V_{LDH}	$PYR + NADH \longleftrightarrow LAC + NAD^+$
7	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	V_{G6PDH}	$G6P + 2NADP^+ \longrightarrow R5P + 2NADPH$
8	Ribulose-5-phosphate epimerase	V_{EP}	$R5P \longrightarrow X5P$
9	Transketolase	V_{TK}	$R5P + 2X5P \longrightarrow 2F6P + GAP$
10	Pyruvate dehydrogenase	V_{PDH}	$PYR + NAD^+ \longrightarrow ACCOA + NADH$
11	Citrate synthase	V_{CS}	$ACCOA + OXA \longrightarrow CIT$
12	Aconitase/isocitrate dehydrogenase	V_{CITS}	$CIT + NAD^+ \longrightarrow AKG + NADH$
13	Alpha ketoglutarate dehydrogenase	V_{AKGDH}	$AKG + NAD^+ \longrightarrow SUC + NADH$
14	Succinate dehydrogenase	V_{SDH}	$SUC + ADP + 2/3 NAD^+ \longrightarrow MAD + ATP + 2/3 NADH$
15	Malate dehydrogenase	V_{MLD}	$MAL + NAD^+ \longrightarrow OXA + NADH$
16	Pyruvate carboxylase	V_{PC}	$PYR + ATP \longrightarrow OXA + ADP$
17	Malic enzyme	V_{ME}	$MAL + NAD^+ \longrightarrow PYR + NADH$
18	Glutamine synthetase	V_{GlnT}	$EGLN + ADP \longleftrightarrow GLU + ATP + NH_4^+$
19	Glutamate dehydrogenase	V_{GLDH}	$GLU + NAD^+ \longleftrightarrow AKG + NH_4^+ + NADH$
20	Alanine aminotranferase	V_{AlaTA}	$PYR + GLU \longleftrightarrow AKG + ALA$
21	Asparaginase	V_{ASN}	$ASN \longrightarrow ASP + NH_4^+$
22	Aspartate aminotransferase	V_{ASTA}	$ASP + AKG \longrightarrow OXA + GLU$
23	Amino acids transamination	$V_{AAtoSUC}$	$LYS + ILE + LEU + VAL + TYR + 7AKG + ATP + 9NAD + 2NADP \longleftrightarrow 4GLU + 3SUC + MAL + 8ACCOA + ADP + 9NADH + 2NADPH$
24	Histidine/arginine transamination	$V_{HISARGTA}$	$HIS + ARG + AKG \longrightarrow 4GLU + NH_4^+$
25	Glutamate transport	V_{GluT}	$GLU \longrightarrow EGLU$

Tableau 2.2 (suite): Reactions of the metabolic model

No	Name	Abbreviation	Stoichiometry
26	Serine dehydratase	V_{SDHH}	$SER \longrightarrow PYR + NH_4^+$
27	ATPase	V_{ATPase}	$ATP \longrightarrow ADP$
28	NADPH oxidase	$V_{NADPHox}$	$NADPH \longrightarrow NADP^+$
29	Respiration	V_{resp}	$2NADH + O_2 + (2P/O_{ratio}) ADP$ $\longrightarrow 2NAD^+ + 2ATP$
30	Leak	V_{leak}	$2NADH \longrightarrow 2NAD^+$
31	Adenylate kinase	V_{AK}	$ATP + AMP \longleftrightarrow 2ADP$
32	Nucleotide synthesis	V_{PPRibP}	$0.6R5P + 2EGLN + 2ASP + GLY + 2ATP$ $\longrightarrow 2ADP + AMP + 2GLY + 2MAL$
33	Biomass synthesis	V_{growth}	$0.06ALA + 0.04ARG + 0.04ASN + 0.03ASP$ $+ 0.02GLN + 0.04GLU + 0.06GLY + 0.02HIS$ $+ 0.09ILE + 0.06LYS + 0.01MET + 0.02PHE$ $+ 0.03PRO + 0.05SER + 0.04THR + 0.02TYR$ $+ 0.04VAL + 3.78ATP + 0.03G6P + 0.03R5P$ $+ 0.09CIT \longrightarrow X + 3.78ADP$
34	mAb synthesis		$0.06ALA + 0.02ARG + 0.05ASN + 0.04ASP + 0.04GLN$ $+ 0.05GLU + 0.07GLY + 0.02HIS + 0.10ILE + 0.06LYS$ $+ 0.01MET + 0.04PHE + 0.07PRO + 0.11SER + 0.11THR$ $+ 0.03TYR + 0.09VAL + 4ATP \longrightarrow mAb + 4ADP$

All units are in millimole. Conversion factors for biomass and mAb are $2.93 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$ and $9.17 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ respectively.

Tableau 2.3: Kinetic rate equations

No	Equation
1	$V_{HK} = V_{\max HK} \frac{EGLC \left(1 + \frac{\beta_{AMP/ATP} AMP/ATP}{\alpha_{AMP/ATP} K_{A_{AMP/ATP}}} \right)}{K_{mEGLC} \left(1 + \frac{AMP/ATP}{K_{A_{AMP/ATP}}} \right) + EGLC \left(1 + \frac{AMP/ATP}{\alpha_{AMP/ATP} K_{A_{AMP/ATP}}} \right)}$ $* \frac{ATP/ADP}{K_{mATP/ADP} + ATP/ADP} * \frac{EGLC}{K_{mEGLC} + EGLC} * \frac{K_{dG6P}}{K_{dG6P} + G6P}$
2	$V_{PGI} = V_{f \max PGI} * \frac{G6P}{K_{mG6P} + G6P} * \frac{K_{dPEP}}{K_{dPEP} + PEP} - V_{r \max PGI} * \frac{F6P}{K_{mG6P} + F6P}$
3	$V_{PFK} = V_{\max PFK} \frac{F6P \left(1 + \frac{\beta_{AMP/ATP} AMP/ATP}{\alpha_{AMP/ATP} K_{A_{AMP/ATP}}} \right)}{K_{mF6P} \left(1 + \frac{AMP/ATP}{K_{A_{AMP/ATP}}} \right) + F6P \left(1 + \frac{AMP/ATP}{\alpha_{AMP/ATP} K_{A_{AMP/ATP}}} \right)}$ $* \frac{ATP/ADP}{K_{mATP/ADP} + ATP/ADP} * \frac{K_{dLAC}}{K_{dLAC} + LAC}$
4	$V_{PGK} = V_{\max PGK} * \frac{GAP}{K_{mG6P} + GAP} * \frac{ADP/ATP}{K_{mADP/ATP} + ADP/ATP} * \frac{NAD/NADH}{K_{mNAD/NADH} + NAD/NADH}$
5	$V_{PK} = V_{\max PK} \frac{PEP \left(1 + \frac{\beta_{F6P} F6P}{\alpha_{F6P} K_{A_{F6P}}} \right)}{K_{mPEP} \left(1 + \frac{F6P}{K_{A_{F6P}}} \right) + F6P \left(1 + \frac{F6P}{K_{A_{F6P}}} \right)} * \frac{ADP/ATP}{K_{mADP/ATP} + ADP/ATP} * \frac{K_{dALA}}{K_{dALA} + A}$
6	$V_{LDH} = V_{f \max LDH} \frac{PYR \left(1 + \frac{\beta_{AMP/ATP} AMP/ATP}{\alpha_{AMP/ATP} K_{A_{AMP/ATP}}} \right)}{K_{mPYR} \left(1 + \frac{AMP/ATP}{K_{A_{AMP/ATP}}} \right) + PYR \left(1 + \frac{AMP/ATP}{\alpha_{AMP/ATP} K_{A_{AMP/ATP}}} \right)} * \frac{NADH/NAD}{K_{mNADH/NAD} + NADH/NAD}$ $- V_{r \max LDH} \frac{LAC}{K_{mLAC} + LAC} * \frac{NAD/NADH}{K_{mNAD/NADH} + NAD/NADH} * \frac{K_{dPYR}}{K_{dPYR} + PYR}$

Tableau 2.3 (suite): Kinetic rate equations

No	Equation
7	$V_{G6PDH} = V_{\max G6PDH} * \frac{G6P}{K_{mG6P} + G6P} * \frac{NADP/NADPH}{K_{mNADP/NADPH} + NADP/NADPH}$
8	$V_{EP} = V_{\max EP} * \frac{R5P}{K_{mR5P} + R5P}$
9	$V_{TK} = V_{\max TK} * \frac{R5P}{K_{mR5P} + R5P} * \frac{X5P}{K_{mX5P} + X5P}$
10	$V_{PDH} = V_{\max PDH} * \frac{PYR}{K_{mPYR} + PYR} * \frac{NAD/NADH}{K_{mNAD/NADH} + NAD/NADH}$
11	$V_{CS} = V_{\max CS} * \frac{OXA}{K_{mOXA} + OXA} * \frac{ACCOA}{K_{mACCOA} + ACCOA}$
12	$V_{CITS} = V_{\max CITS} * \frac{CIT}{K_{mCIT} + CIT} * \frac{NAD/NADH}{K_{mNAD/NADH} + NAD/NADH}$
13	$V_{AKGDH} = V_{\max AKGDH} * \frac{AKG}{K_{mAKG} + AKG} * \frac{NAD/NADH}{K_{mNAD/NADH} + NAD/NADH}$
14	$V_{SUC} = V_{\max SUC} * \frac{SUC}{K_{mSUC} + SUC} * \frac{NAD/NADH}{K_{mNAD/NADH} + NAD/NADH} * \frac{ADP/ATP}{K_{mADP/ATP} + ADP/ATP}$
15	$V_{MLD} = V_{\max MLD} * \frac{MAL}{K_{mMAL} + MAL} * \frac{NAD/NADH}{K_{mNAD/NADH} + NAD/NADH}$
16	$V_{PC} = V_{\max PC} * \frac{PYR}{K_{mPYR} + PYR} * \frac{ADP/ATP}{K_{mADP/ATP} + ADP/ATP}$
17	$V_{ME} = V_{\max ME} * \frac{MAL}{K_{mMAL} + MAL} * \frac{NAD/NADH}{K_{mNAD/NADH} + NAD/NADH}$
18	$V_{GlnT} = V_{\max GlnT} * \frac{EGLN}{K_{mEGLN} + EGLN} * \frac{ATP/ADP}{K_{mATP/ADP} + ATP/ADP}$ $-V_{\max GlnT} * \frac{GLU}{K_{mGLU} + GLU} * \frac{ADP/ATP}{K_{mADP/ATP} + ADP/ATP} * \frac{NH_4}{K_{mNH_4} + NH_4}$

Tableau 2.3 (suite): Kinetic rate equations

No	Equation
19	$V_{\text{GLDH}} = V_{\text{fmaxGLDH}} * \frac{\text{GLU}}{K_{\text{mGLU}} + \text{GLU}} * \frac{\text{NAD/NADH}}{K_{\text{mNAD/NADH}} + \text{NAD/NADH}}$ $-V_{\text{rmaxGLDH}} * \frac{\text{AKG}}{K_{\text{mAKG}} + \text{AKG}} * \frac{\text{NADH/NAD}}{K_{\text{mNADH/NAD}} + \text{NADH/NAD}} * \frac{\text{NH}_4}{K_{\text{mNH}_4} + \text{NH}_4}$
20	$V_{\text{AlaTA}} = V_{\text{fmaxAlaTA}} * \frac{\text{GLU}}{K_{\text{mGLU}} + \text{GLU}} * \frac{\text{PYR}}{K_{\text{mPYR}} + \text{PYR}}$ $-V_{\text{rmaxAlaTA}} * \frac{\text{ALA}}{K_{\text{mALA}} + \text{ALA}} * \frac{\text{AKG}}{K_{\text{mAKG}} + \text{AKG}} * \frac{K_{\text{dEGLN}}}{K_{\text{dEGLN}} + \text{EGLN}}$
21	$V_{\text{ASN}} = V_{\text{maxASN}} * \frac{\text{ASN}}{K_{\text{mASN}} + \text{ASN}}$
22	$V_{\text{ASTA}} = V_{\text{maxASTA}} * \frac{\text{AKG}}{K_{\text{mAKG}} + \text{AKG}} * \frac{\text{ASP}}{K_{\text{mASP}} + \text{ASP}}$
23	$V_{\text{AAtoSUC}} = V_{\text{maxAAtoSUC}} * \frac{\text{LYS}}{K_{\text{mLYS}} + \text{LYS}} * \frac{\text{ILE}}{K_{\text{mILE}} + \text{ILE}} * \frac{\text{AKG}}{K_{\text{mAKG}} + \text{AKG}} * \frac{\text{VAL}}{K_{\text{mVAL}} + \text{VAL}}$ $* \frac{\text{NAD/NADH}}{K_{\text{mNAD/NADH}} + \text{NAD/NADH}} * \frac{\text{NAPD/NAPDH}}{K_{\text{mNAPD/NAPDH}} + \text{NAPD/NAPDH}} * \frac{\text{ATP/ADP}}{K_{\text{mATP/ADP}} + \text{ATP/ADP}}$
24	$V_{\text{HISARGTA}} = V_{\text{maxHISARGTA}} * \frac{\text{HIS}}{K_{\text{mHIS}} + \text{HIS}} * \frac{\text{ARG}}{K_{\text{mARG}} + \text{ARG}} * \frac{\text{LEU}}{K_{\text{mLEU}} + \text{LEU}} * \frac{\text{AKG}}{K_{\text{mAKG}} + \text{AKG}}$
25	$V_{\text{GluT}} = V_{\text{fmaxGluT}} * \frac{\text{GLU}}{K_{\text{mGLU}} + \text{GLU}} - V_{\text{rmaxGluT}} * \frac{\text{EGLU}}{K_{\text{mEGLU}} + \text{EGLU}}$
26	$V_{\text{SDHH}} = V_{\text{maxSDHH}} * \frac{\text{SER}}{K_{\text{mSER}} + \text{SER}}$
27	$V_{\text{ATPase}} = V_{\text{maxATPase}} * \frac{\text{ATP}}{K_{\text{mATP}} + \text{ATP}}$
28	$V_{\text{NADPHox}} = V_{\text{maxNADPHox}} * \frac{\text{NADPH}}{K_{\text{mNADPH}} + \text{NADPH}}$
29	$V_{\text{resp}} = V_{\text{maxresp}} * \frac{\text{ADP/ATP}}{K_{\text{mADP/ATP}} + \text{ADP/ATP}} * \frac{\text{NADH}}{K_{\text{mNADH}} + \text{NADH}}$

Tableau 2.3 (suite): Kinetic rate equations

No	Equation
30	$V_{\text{leak}} = V_{\text{maxleak}} * \frac{\text{NADH}}{K_{\text{mNADH}} + \text{NADH}}$
31	$V_{\text{AK}} = V_{\text{fmaxAK}} * \frac{\text{AMP}}{K_{\text{mAMP}} + \text{AMP}} * \frac{\text{ATP}}{K_{\text{mATP}} + \text{ATP}} - V_{\text{rmaxAK}} * \frac{\text{ADP}}{K_{\text{mADP}} + \text{ADP}}$
32	$V_{\text{PPRibP}} = V_{\text{maxPPRibP}} * \frac{\text{R5P}}{K_{\text{mR5P}} + \text{R5P}} * \frac{\text{EGLN}}{K_{\text{mEGLN}} + \text{EGLN}} * \frac{\text{ASP}}{K_{\text{mASP}} + \text{ASP}} * \frac{\text{GLY}}{K_{\text{mGLY}} + \text{GLY}} * \frac{\text{ATP}}{K_{\text{mATP}} + \text{ATP}}$
33	$V_{\text{growth}} = V_{\text{maxgrowth}} * \frac{\text{G6P}}{K_{\text{mG6Pgrowth}} + \text{G6P}} * \frac{\text{R5P}}{K_{\text{mR5Pgrowth}} + \text{R5P}} * \frac{\text{LYS}}{K_{\text{mLYSgrowth}} + \text{LYS}} * \frac{\text{CIT}}{K_{\text{mCITgrowth}} + \text{CIT}} * \frac{\text{ILE}}{K_{\text{mILEgrowth}} + \text{ILE}} * \frac{\text{VAL}}{K_{\text{mVALgrowth}} + \text{VAL}} * \frac{\text{TYR}}{K_{\text{mTYRgrowth}} + \text{TYR}} * \frac{\text{ASN}}{K_{\text{mASNgrowth}} + \text{ASN}} * \frac{\text{ASP}}{K_{\text{mASPgrowth}} + \text{ASP}} * \frac{\text{ALA}}{K_{\text{mALAgrowth}} + \text{ALA}} * \frac{\text{ARG}}{K_{\text{mARGgrowth}} + \text{ARG}} * \frac{\text{EGLN}}{K_{\text{mGLNgrowth}} + \text{EGLN}} * \frac{\text{EGLU}}{K_{\text{mEGLUgrowth}} + \text{EGLU}} * \frac{\text{GLY}}{K_{\text{mGLYgrowth}} + \text{GLY}} * \frac{\text{HIS}}{K_{\text{mgrowth}} + \text{HIS}} * \frac{\text{PHE}}{K_{\text{mPHEgrowth}} + \text{PHE}} * \frac{\text{PRO}}{K_{\text{mPROgrowth}} + \text{PRO}} * \frac{\text{TYR}}{K_{\text{mTYRgrowth}} + \text{TYR}} * \frac{\text{THR}}{K_{\text{mTHRgrowth}} + \text{THR}} * \frac{K_{\text{dLACgrowth}}}{K_{\text{dLACgrowth}} + \text{LAC}} * \frac{K_{\text{dNH}_4\text{growth}}}{K_{\text{dNH}_4\text{growth}} + \text{NH}_4} * \frac{\text{ATP}}{K_{\text{mATPgrowth}} + \text{ATP}}$
34	$V_{\text{mAb}} = V_{\text{maxmAb}} * \frac{\text{LYS}}{K_{\text{mLYSmAb}} + \text{LYS}} * \frac{\text{ILE}}{K_{\text{mILEmAb}} + \text{ILE}} * \frac{\text{VAL}}{K_{\text{mVALmAb}} + \text{VAL}} * \frac{\text{TYR}}{K_{\text{mTYRmAb}} + \text{TYR}} * \frac{\text{ASN}}{K_{\text{mASNmAb}} + \text{ASN}} * \frac{\text{ASP}}{K_{\text{mASPMAb}} + \text{ASP}} * \frac{\text{ALA}}{K_{\text{mALAmAb}} + \text{ALA}} * \frac{\text{ARG}}{K_{\text{mARGmAb}} + \text{ARG}} * \frac{\text{EGLN}}{K_{\text{mGLNmAb}} + \text{EGLN}} * \frac{\text{EGLU}}{K_{\text{mEGLUmAb}} + \text{EGLU}} * \frac{\text{GLY}}{K_{\text{mGLYmAb}} + \text{GLY}} * \frac{\text{HIS}}{K_{\text{mHISmAb}} + \text{HIS}} * \frac{\text{PHE}}{K_{\text{mPHEmAb}} + \text{PHE}} * \frac{\text{PRO}}{K_{\text{mPROmAb}} + \text{PRO}} * \frac{\text{TYR}}{K_{\text{mTYRmAb}} + \text{TYR}} * \frac{\text{THR}}{K_{\text{mTHRmAb}} + \text{THR}} * \frac{\text{ATP}}{K_{\text{mATPmAb}} + \text{ATP}}$

Tableau 2.4: State variable and initial conditions

Components	Unit	Biogro-CHO		PowerCHO-2	
		Batch	Fed-batch	Batch	Fed-batch
ACCOA	mmol. 10^{-6} cell	1.4E-7	1.4E-7	1.4E-7	1.4E-7
ADP	mmol. 10^{-6}	6.7E-7	6.7E-7	6.7E-7	6.7E-7
AKG	mmol. 10^{-6}	1.0E-7	1.0E-7	1.0E-7	1.0E-7
ALA	mM	9.6E-1	9.6E-1	7.3E-1	7.3E-1
AMP	mmol. 10^{-6} cell	3.1E-7	3.1E-7	2.5E-7	2.5E-7
ARG	mM	2.4	2.4	6.4	6.4
ASN	mM	4.8E-1	4.8E-1	6.9	6.9
ASP	mM	2.0	2.0	9.5	9.5
ATP	mmol. 10^{-6} cell	7.0E-6	2.2E-6	3.5E-6	3.5E-6
CIT	mmol. 10^{-6} cell	1.0E-6	1.0E-6	1.0E-6	1.0E-6
CYS	mM	1.0E-1	1.0E-1	2.1E-2	2.1E-2
EGLC	mM	26	10	43	4.11
EGLN	mM	3.7	2.4	6.0	6.0
EGLU	mM	8.0E-1	8.0E-1	8.0E-1	8.0E-1
F6P	mmol. 10^{-6} cell	2.2E-7	2.2E-7	2.2E-7	2.2E-7
G6P	mmol. 10^{-6} cell	1.6E-7	1.6E-7	1.6E-7	1.6E-7
GAP	mmol. 10^{-6} cell	4.0E-7	4.0E-7	4.0E-7	4.0E-7
GLU	mmol. 10^{-6} cell	2.2E-4	2.2E-4	2.2E-4	2.2E-4
GLY	mM	7.8E-1	7.8E-1	5.8	5.8
HIS	mM	8.5E-1	8.5E-1	9.4E-1	7.0E-1
ILE	mM	2.2	2.2	7.4	5.0
LAC	mM	7.5E-1	7.5E-1	7.5E-1	7.5E-1
LEU	mM	9.7E-1	9.7E-1	9.7E-1	9.7E-1
LYS	mM	2.1	2.1	5.7	5.7
mAb	mg.L ⁻¹	0.0	0.0	0.0	0.0
MAL	mmol. 10^{-6} cell	1.5E-6	1.5E-6	1.5E-6	1.5E-6
MET	mM	4.3E-1	4.3E-1	1.7	1.1

Tableau 2.4 (suite): State variables and initial conditions

Components	Unit	Biogro-CHO		PowerCHO-2	
		Batch	Fed-batch	Batch	Fed-batch
NAD	mmol.10 ⁻⁶ cell	6.9E-7	6.9E-7	6.9E-7	6.9E-7
NADH	mmol.10 ⁻⁶ cell	8.5E-7	8.5E-7	8.5E-7	8.5E-7
NADP	mmol.10 ⁻⁶ cell	3.5E-7	3.5E-7	2.7E-7	2.7E-7
NADPH	mmol.10 ⁻⁶ cell	2.3E-7	2.3E-7	1.5E-7	1.5E-7
NH4	mM	2.0E-1	2.0E-1	2.0E-1	2.0E-1
OXA	mmol.10 ⁻⁶ cell	1.0E-6	1.0E-6	1.0E-6	1.0E-6
PEP	mmol.10 ⁻⁶ cell	8.8E-7	8.8E-7	1.8E-7	1.8E-7
PHE	mM	1.1	1.1	1.0	6.1E-1
PRO	mM	6.5E-1	6.5E-1	2.3	1.4
PYR	mmol.10 ⁻⁶ cell	2.0E-6	2.0E-6	6.5E-6	6.5E-6
R5P	mmol.10 ⁻⁶ cell	5.4E-8	5.4E-8	5.4E-8	5.4E-8
SER	mM	8.3E-1	8.3E-1	8.9	5.8
SUC	mmol.10 ⁻⁶ cell	8.0E-8	8.0E-8	8.0E-8	8.0E-8
THR	mM	1.1	1.1	1.1	1.1
TYR	mM	1.3	1.3	1.2	1.2
VAL	mM	7.0E-1	7.0E-1	1.0	1.0

Tableau 2.5: Parameter values

Parameter	Units	Value	Confidence region
$\alpha_{\text{AMP/ATP}}$	-	4.7E-01	[4.4E-01 5.1E-01]
α_{F6P}	-	4.1E+00	-
$\beta_{\text{AMP/ATP}}$	-	1.046E+01	[1.045E+01 1.046E+01]
β_{F6P}	-	1.7E+00	-
$K_{\text{A}_{\text{AMP/ATP}}}$	-	9.0E-02	[8.8E-02 9.3E-02]
$K_{\text{A}_{\text{F6P}}}$	mmol. 10^{-6} cells	4.9E-06	-
K_{dCIT}	mmol. 10^{-6} cells	7.4E-04	-
K_{dEGLN}	mM	3.5E+00	-
K_{dG6P}	mmol. 10^{-6} cells	1.710841E-08	[1.710839E-08 1.710842E-08]
K_{dLAC}	mM	6.3E+00	-
K_{dPEP}	mmol. 10^{-6} cells	3.7E-07	-
K_{dPYR}	mmol. 10^{-6} cells	4.5E-07	-
$K_{\text{dLAC}_{\text{growth}}}$	mM	1.7E+02	-
$K_{\text{dNH}_{4\text{growth}}}$	mM	4.44E+00	[4.13E+00 4.74E+00]
K_{mACCOA}	mmol. 10^{-6} cells	8.6E-07	-
K_{mADP}	mmol. 10^{-6} cells	7.2E-07	-
K_{mAKG}	mmol. 10^{-6} cells	1.1E-06	-
K_{mALA}	mM	1.8E+01	-
K_{mAMP}	mmol. 10^{-6} cells	2.4E-09	-
K_{mARG}	mM	7.3E-02	-
K_{mASP}	mM	4.0E-02	-
K_{mASN}	mM	1.2E+00	-
K_{mATP}	mmol. 10^{-6} cells	1.56E-05	[1.55E-05 1.57E-05]
K_{mCIT}	mmol. 10^{-6} cells	1.6E-07	-
K_{mEGLC}	mM	2.0E+01	-
K_{mEGLN}	mM	2.3E+00	-

Tableau 2.5 (suite): Parameter values

Parameter	Units	Value	Confidence region
$K_{m\text{EGLU}}$	mM	6.6E+00	-
$K_{m\text{F6P}}$	mmol. 10^{-6} cells	2.6E-06	-
$K_{m\text{G6P}}$	mmol. 10^{-6} cells	2.866E-08	[2.865E-08 2.866E-08]
$K_{m\text{GAP}}$	mmol. 10^{-6} cells	7.8E-07	-
$K_{m\text{GLU}}$	mmol. 10^{-6} cells	7.5E-05	-
$K_{m\text{GLY}}$	mmol. 10^{-6} cells	5.0E-02	-
$K_{m\text{HIS}}$	mM	5.8E-01	-
$K_{m\text{LE}}$	mM	3.8E-02	-
$K_{m\text{LAC}}$	mM	2.9E+00	-
$K_{m\text{LEU}}$	mM	0.-	-
$K_{m\text{LYS}}$	mM	9.8E-02	-
$K_{m\text{MAL}}$	mmol. 10^{-6} cells	2.7E-06	-
$K_{m\text{NADH}}$	mmol. 10^{-6} cells	2.6E-06	[2.4E-06 2.8E-06]
$K_{m\text{NADPH}}$	mmol. 10^{-6} cells	8.4E-08	-
$K_{m\text{NH}_4}$	mM	1.1E+00	-
$K_{m\text{OXA}}$	mmol. 10^{-6} cells	2.2E-07	-
$K_{m\text{PEP}}$	mmol. 10^{-6} cells	1.7E-07	-
$K_{m\text{PYR}}$	mmol. 10^{-6} cells	3.9E-06	-
$K_{m\text{R5P}}$	mmol. 10^{-6} cells	7.0E-08	-
$K_{m\text{SER}}$	mM	2.2E-01	-
$K_{m\text{SUC}}$	mmol. 10^{-6} cells	2.3E-07	-
$K_{m\text{TYR}}$	mM	4.8E-02	-
$K_{m\text{VAL}}$	mM	1.-	-
$K_{m\text{X5P}}$	mmol. 10^{-6} cells	1.1E-08	-
P_{ratio}	-	2.1E+00	-
$V_{f\text{maxAK}}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	1.8E-08	[1.7E-08 1.9E-08]
$V_{r\text{maxAK}}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	1.2E-08	[1.1E-08 1.2E-08]
V_{maxAKGDH}	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	2.6E-04	-

Tableau 2.5 (suite): Parameter values

Parameter	Units	Value	Confidence region
$V_{f \max AlaTA}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.7E-04	
$V_{r \max AlaTA}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	2.4E-04	-
$V_{\max ASN}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	6.2E-06	-
$V_{f \max ASTA}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	7.8E-05	-
$V_{\max ATPase}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	9.14E-04	[9.09E-04 9.13E-04]
$V_{\max CITS}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	3.9E-05	-
$V_{\max CS}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	8.8E-05	-
$V_{\max EP}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.3E-05	-
$V_{\max G6PDH}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.5E-05	-
$V_{f \max GLDH}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.2E-06	-
$V_{r \max GLDH}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	6.3E-05	-
$V_{f \max GlnT}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.27E-04	[1.11E-04 1.42E-04]
$V_{r \max GlnT}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.9E-05	-
$V_{f \max GluT}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.8E-06	-
$V_{r \max GluT}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	2.5E-06	-
$V_{\max growth}$	h^{-1}	6.6E-02	[6.5E-02 6.7E-02]
$V_{\max HISARGTA}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.9E-05	-
$V_{\max HK}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	6.6E-04	[6.2E-04 6.9E-04]
$V_{f \max LDH}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.7E-03	-
$V_{r \max LDH}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	2.4E-04	-
$V_{\max leak}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	2.9E-05	[2.8E-05 3.0E-05]
$V_{\max AAtoSUC}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.3E-04	-
$V_{\max mAb}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	2.2E-04	-
$V_{\max ME}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.3E-05	-
$V_{\max MLD}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	9.5E-05	-
$V_{\max NADPHox}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.4E-05	-
$V_{\max PC}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	2.1E-04	-
$V_{\max PDH}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	7.1E-05	-
$V_{\max PFK}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.5E-03	-

Tableau 2.5 (suite): Parameter values

Parameter	Units	Value	Confidence region
$V_{f \max PGI}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	7.6E-04	[6.9E-04 8.3E-04]
$V_{r \max PGI}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	3.5E-04	-
$V_{\max PGK}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.065E-03	[1.055E-03 1.075E-03]
$V_{\max PK}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.376E-03	[1.373E-03 1.378E-03]
$V_{\max PPRibP}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	2.6E-09	-
$V_{\max resp}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	1.40E-03	[1.29E-03 1.50E-03]
$V_{\max SDH}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	4.0E-04	-
$V_{\max SDHH}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	8.5E-06	-
$V_{\max TK}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$	2.3E-05	-
$K_{mALA_{growth}}$	mM	7.6E-02	-
$K_{mARG_{growth}}$	mM	1.5E-02	-
$K_{mASN_{growth}}$	mM	4.2E-03	-
$K_{mASP_{growth}}$	mM	1.0E-02	-
$K_{mATP_{growth}}$	mM	1.4E-07	-
$K_{mCIT_{growth}}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells}$	3.5E-09	-
$K_{mCYS_{growth}}$	mM	1.0E-03	-
$K_{mEGLN_{growth}}$	mM	1.4E-03	-
$K_{mG6P_{growth}}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells}$	9.9E-13	-
$K_{mGLU_{growth}}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells}$	1.7E-06	-
$K_{mGLY_{growth}}$	mM	1.0E-02	-
$K_{mHIS_{growth}}$	mM	1.7E-02	-
$K_{mILE_{growth}}$	mM	1.0E-02	-
$K_{mLYS_{growth}}$	mM	2.7E-02	-
$K_{mMET_{growth}}$	mM	3.5E-02	-
$K_{mPHE_{growth}}$	mM	1.6E-02	-
$K_{mPRO_{growth}}$	mM	1.0E-02	-
$K_{mR5P_{growth}}$	$\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells}$	1.1E-10	-

Tableau 2.5 (suite): Parameter values

Parameter	Units	Value	Confidence region
$K_{mSER_{growth}}$	mM	1.1E-03	-
$K_{mTHR_{growth}}$	mM	9.6E-03	-
$K_{mTYR_{growth}}$	mM	1.2E-02	-
$K_{mVAL_{growth}}$	mM	1.3E-02	-
$K_{mALA_{mAb}}$	mM	1.3E-01	-
$K_{mALA_{mAb}}$	mM	6.2E-02	-
$K_{mASN_{mAb}}$	mM	1.4E-06	-
$K_{mASP_{mAb}}$	mM	5.6E-02	-
$K_{mATP_{mAb}}$	mM	1.1E-07	-
$K_{mCYS_{mAb}}$	mM	1.0E-03	-
$K_{mEGLN_{mAb}}$	mM	1.3E-03	-
$K_{mGLU_{mAb}}$	mmol.10 ⁻⁶ cells	2.2E-01	-
$K_{mGLY_{mAb}}$	mM	5.0E-02	-
$K_{mHIS_{mAb}}$	mM	5.7E-02	-
$K_{mILE_{mAb}}$	mM	8.3E-02	-
$K_{mLEU_{mAb}}$	mM	0.-	-
$K_{mLYS_{mAb}}$	mM	5.0E-02	-
$K_{mMET_{mAb}}$	mM	8.0E-02	-
$K_{mPHE_{mAb}}$	mM	7.1E-02	-
$K_{mPRO_{mAb}}$	mM	1.1E-02	-
$K_{mSER_{mAb}}$	mM	1.0E-03	-
$K_{mTHR_{mAb}}$	mM	6.6E-02	-
$K_{mTYR_{mAb}}$	mM	9.8E-02	-
$K_{mVAL_{mAb}}$	mM	7.4E-02	-
$K_{mADP/ATP}$	-	5.69423E-01	[5.69422E-01 5.69425E-01]
$K_{mATP/ADP}$	-	9.1E-01	-

Tableau 2.5 (suite): Parameter values

Parameter	Units	Value	Confidence region
$K_{mNAD/NADH}$	-	4.8E-02	-
$K_{mNADH/NAD}$	-	8.3E+00	-
$K_{mNADP/NADPH}$	-	2.0E+00-	-

Parameter values for all parameters, including non-optimized parameters, and the boundary of their confidence interval (95 %), when it applied. All the data available was used for parameter estimation (four cultures).

Tableau 2.6: Parameter values for the 20 most sensitive parameters for different media and culture modes

Parameters	All cultures		Fed-batch cultures		Batch cultures		Biogro-CHO		PowerCHO-2	
	Values	Confidence intervals	Values	Confidence intervals	Values	Confidence intervals	Values	Confidence intervals	Values	Confidence intervals
$V_{\max\text{growth}}$	6.6E-2	8E-4	6.6E-2	9E-9	6.6E-2	4E-4	6.6E-2	3E-3	7.2E-2	1E-2
$V_{\max\text{PK}}$	1.4E-3	3E-6	1.4E-3	2E-4	1.4E-3	1E-5	1.4E-3	3E-5	1.4E-3	2E-5
$V_{r\max\text{AK}}$	1.2E-8	7E-10	1.2E-8	1E-8	1.2E-8	2E-9	1.2E-8	4E-9	1.1E-8	7E-11
$V_{\max\text{PGK}}$	1.1E-3	1E-5	1.1E-3	1E-4	1.1E-3	6E-8	1.1E-3	2E-5	9.9E-4	5E-5
$V_{\max\text{resp}}$	1.4E-3	1E-4	1.4E-3	2E-3	1.5E-3	2E-4	1.4E-3	7E-5	1.7E-3	1E-5
$V_{f\max\text{AK}}$	1.8E-8	9E-10	1.8E-8	2E-8	1.8E-8	4E-9	1.8E-8	7E-10	1.8E-8	4E-9
$V_{\max\text{HK}}$	6.6E-4	4E-5	6.6E-4	3E-4	6.6E-4	3E-4	6.6E-4	9E-10	6.4E-4	6E-4
$V_{\max\text{ATPase}}$	9.1E-4	4E-6	9.1E-4	2E-4	8.3E-4	1E-4	9.1E-4	3E-4	8.1E-4	7E-5
$K_{m\text{ATP}}$	1.6E-5	1E-7	1.6E-5	1E-5	1.6E-5	2E-6	1.6E-5	6E-6	1.8E-5	4E-6
$K_{m\text{ADP/ATP}}$	5.7E-1	1E-6	5.7E-1	1E-6	5.7E-1	1E-2	5.7E-1	1E-1	6.7E-1	1E-2
$K_{m\text{NADH}}$	2.6E-6	2E-7	2.6E-6	4E-6	2.6E-6	3E-7	2.6E-6	1E-7	2.3E-6	9E-8
$K_{d\text{NH}_4\text{growth}}$	4.4E+0	3E-1	4.4E+0	6E-1	4.3E+0	4E-2	4.4E+0	2E+0	3.5E+0	1E+0
$K_{m\text{G6P}}$	2.9E-8	6E-12	2.9E-8	1E-8	2.8E-8	1E-9	2.9E-8	9E-9	3.6E-8	1E-10
$\alpha_{\text{AMP/ATP}}$	4.7E-1	3E-2	4.7E-1	4E-1	4.7E-1	1E-1	4.7E-1	9E-1	5.4E-1	4E-1
$V_{f\max\text{GlnT}}$	1.3E-4	2E-5	1.3E-4	3E-5	1.3E-4	2E-5	1.3E-4	3E-5	1.2E-4	6E-6
$\beta_{\text{AMP/ATP}}$	1.0E+1	2E-3	1.0E+1	8E-1	1.0E+1	2E+0	1.0E+1	9E-6	1.1E+1	2E+0
$V_{\max\text{leak}}$	2.9E-5	1E-6	2.9E-5	4E-5	2.9E-5	2E-6	2.9E-5	1E-5	2.6E-5	1E-5
$V_{f\max\text{PGI}}$	7.6E-4	7E-5	7.6E-4	2E-4	7.6E-4	3E-6	7.6E-4	1E-4	6.5E-4	2E-6
$K_{A_{\text{AMP/ATP}}}$	9.0E-2	3E-3	9.0E-2	7E-2	9.1E-2	3E-4	9.0E-2	2E-1	1.5E-1	1E-1
$K_{d\text{G6P}}$	1.7E-8	1E-14	1.7E-8	1E-14	1.7E-8	2E-9	1.7E-8	4E-11	1.7E-8	1E-8

Parameter values and confidence intervals (95 %) for the same conditions than in Figure 2.5

Tableau 2.7: Parameter values for the most sensitive parameters for different growth phases

Parameters	Exponential growth (0 to 72 h)		End exponential to plateau (>72 h)	
	Mean value	Confidence interval (95 %)	Mean value	Confidence interval (95 %)
$V_{\max\text{growth}}$	6.6E-02	3E-03	6.6E-02	3E-03
$V_{\max\text{PK}}$	1.4E-03	4E-06	1.4E-03	3E-07
$V_{r\max\text{AK}}$	1.2E-08	2E-09	1.2E-08	3E-10
$V_{\max\text{PGK}}$	1.1E-03	4E-05	1.1E-03	4E-06
$V_{\max\text{resp}}$	1.4E-03	2E-05	1.4E-03	3E-07
$V_{f\max\text{AK}}$	1.8E-08	1E-09	1.8E-08	6E-10
$V_{\max\text{HK}}$	6.6E-04	3E-08	6.6E-04	2E-06
$V_{\max\text{ATPase}}$	9.1E-04	2E-04	9.2E-04	3E-06
$K_{m\text{ATP}}$	1.6E-05	7E-07	1.6E-05	1E-07
$K_{m\text{ADP}/\text{ATP}}$	5.7E-01	7E-03	5.7E-01	7E-04
$K_{m\text{NADH}}$	2.6E-06	5E-09	2.6E-06	4E-08
$K_{d\text{NH}_4\text{ growth}}$	4.4E+00	8E-02	4.4E+00	8E-05
$K_{m\text{G6P}}$	2.9E-08	8E-13	2.6E-08	9E-10
$\alpha_{\text{AMP}/\text{ATP}}$	4.7E-01	4E-02	4.7E-01	3E-04
$V_{f\max\text{GlnT}}$	1.3E-04	1E-06	1.3E-04	1E-08
$\beta_{\text{AMP}/\text{ATP}}$	1.0E+01	1E+00	1.0E+01	1E-03
$V_{\max\text{leak}}$	2.9E-05	2E-06	2.9E-05	2E-09
$V_{f\max\text{PGI}}$	7.6E-04	1E-04	7.6E-04	2E-06
$K_{A_{\text{AMP}/\text{ATP}}}$	9.0E-02	1E-03	1.1E-01	2E-04
$K_{d\text{G6P}}$	1.7E-08	6E-18	1.7E-08	2E-11

Parameter values and confidence intervals (95 %) for the same conditions than in Figure 2.6

Tableau 2.8: Metabolic fluxes at 48 and 96 h (Batch cultures)

Metabolic fluxes	Batch, Biogro-CHO				Batch, PowerCHO-2			
	Mean value		Confidence interval		Mean value		Confidence interval	
	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h
V_{HK}	2.1E-04	7.9E-05	1.6E-05	2.1E-05	2.2E-04	1.4E-04	1.6E-05	1.4E-05
Lactate production	1.9E-04	6.6E-05	1.5E-05	1.3E-05	1.9E-04	1.3E-04	1.6E-05	1.2E-05
Pentose phosphate pathway	3.6E-06	3.3E-06	3.0E-07	7.2E-07	3.7E-06	3.9E-06	2.5E-07	2.2E-07
Glutamine consumption	4.5E-05	1.4E-06	5.8E-06	1.1E-06	5.9E-05	1.3E-05	8.6E-06	8.2E-06
Alanine production	3.6E-05	1.5E-05	3.2E-06	2.1E-06	3.8E-05	2.8E-05	3.7E-06	3.1E-06
Ammonia production	5.5E-05	2.1E-06	5.8E-06	1.2E-06	7.7E-05	3.0E-05	8.6E-06	8.3E-06
TCA cycle	7.4E-05	3.1E-05	7.1E-06	4.0E-06	7.7E-05	5.5E-05	8.1E-06	6.9E-06
Pyruvate dehydrogenase	1.6E-05	7.5E-06	1.6E-06	1.3E-06	1.7E-05	1.4E-05	1.8E-06	1.7E-06
Net ATP production	1.1E-03	4.3E-04	7.0E-05	5.5E-05	1.1E-03	7.4E-04	9.4E-05	9.4E-05

Metabolic fluxes (all in $\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$) and their confidence intervals at 48 h and 96 h for the same conditions than in Figure 2.7 (Batch cultures only). Definition for ammonia production, TCA cycle and net ATP production are the same than in Figure 2.7.

Tableau 2.9: Metabolic fluxes at 48 and 96 h (Fed-batch cultures)

Metabolic fluxes	Fed-batch, Biogro-CHO				Fed-batch, PowerCHO-2			
	Mean value		Confidence interval		Confidence interval		Mean value	
	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h
Glucose consumption	2.7E-04	1.7E-04	2.6E-05	1.3E-05	2.3E-04	1.6E-04	1.6E-05	1.1E-05
Lactate production	1.9E-04	1.1E-04	1.5E-05	1.6E-05	1.8E-04	1.3E-04	1.4E-05	1.1E-05
Pentose phosphate pathway	3.4E-06	3.9E-06	2.9E-07	1.9E-07	3.6E-06	3.8E-06	2.2E-07	1.8E-07
Glutamine consumption	5.5E-05	4.9E-05	8.1E-06	3.5E-06	6.2E-05	5.5E-05	9.2E-06	6.2E-06
Alanine production	3.5E-05	2.6E-05	3.1E-06	3.8E-06	3.6E-05	2.9E-05	3.2E-06	3.0E-06
Ammonia production	6.5E-05	5.2E-05	8.1E-06	4.0E-06	8.1E-05	7.3E-05	9.2E-06	6.2E-06
TCA cycle	7.3E-05	4.8E-05	6.9E-06	7.8E-06	7.2E-05	5.6E-05	7.1E-06	6.4E-06
Pyruvate dehydrogenase	1.6E-05	1.1E-06	1.6E-06	1.9E-06	1.6E-05	1.3E-05	1.6E-06	1.5E-06
Net ATP production	1.0E-03	7.1E-04	6.5E-05	9.3E-05	1.0E-03	7.6E-04	6.7E-05	6.7E-05

Metabolic fluxes (all in $\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$) and their confidence intervals at 48 h and 96 h for the same conditions than in Figure 2.7 (Fed-batch cultures only). Definition for ammonia production, TCA cycle and net ATP production are the same than in Figure 2.7.

Tableau 2.10: Metabolic flux ratios at 48 and 96 h

Metabolic flux	Fed-batch, Biogro-CHO				Fed-batch, PowerCHO-2				Fed-batch, Biogro-CHO				Fed-batch, PowerCHO-2			
	Mean		Confidence		Mean		Confidence		Mean		Confidence		Mean		Confidence	
	value		interval		value		interval		value		interval		value		interval	
	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h
V_{LDH}/V_{PK}	0.78	0.74	0.03	0.03	0.78	0.74	0.02	0.03	0.79	0.78	0.03	0.03	0.78	0.77	0.03	0.03
V_{PDH}/V_{PK}	0.07	0.08	0.01	0.01	0.07	0.05	0.01	0.01	0.07	0.08	0.01	0.01	0.07	0.08	0.01	0.01
Net ATP production from glycolysis	0.47	0.41	0.03	0.03	0.46	0.42	0.03	0.02	0.45	0.42	0.03	0.02	0.46	0.45	0.03	0.03
V_{PDH}/TCA cycle	0.22	0.24	0.005	0.01	0.22	0.16	0.01	0.01	0.22	0.22	0.004	0.01	0.22	0.25	0.005	0.01
Amino acids contribution to TCA cycle	0.60	0.67	0.01	0.02	0.61	0.65	0.01	0.01	0.62	0.65	0.01	0.01	0.61	0.61	0.01	0.01
Net ATP production from respiration	0.45	0.54	0.03	0.03	0.44	0.47	0.03	0.03	0.45	0.46	0.03	0.03	0.45	0.49	0.03	0.03

Metabolic ratios (all in $\text{mmol} \cdot 10^{-6} \text{cells} \cdot \text{h}^{-1}$) and their confidence intervals at 48 h and 96 h for the same conditions than in Figure 2.8.

Definition for ammonia production, TCA cycle and net ATP production are the same than in Figure 2.8.

CHAPITRE 3 DISCUSSION GÉNÉRALE

Le présent mémoire se donnait comme mandat de développer un modèle métabolique dynamique qui permet de représenter de manière efficace le métabolisme des cellules CHO en mode cuvée alimentée et sous diverses conditions initiales de milieu nutritif. Ce chapitre poursuit la discussion des résultats expérimentaux et des résultats de simulation entreprise au chapitre précédent.

3.1 Effets du milieu et de l'alimentation sur les résultats obtenus

Les cultures en bioréacteurs réalisées dans le cadre de ce mémoire ont permis d'établir une comparaison entre deux cultures en mode cuvée-alimentée utilisant deux milieux de culture différents. Tel que mentionné au Chapitre 2 Section 2.5.1, il existe un effet négatif réel lorsque l'on utilise un milieu de culture moins performant quant à la croissance cellulaire (Biogro-CHO) au lieu d'un milieu de culture plus performant (PowerCHO-2), une augmentation de la concentration finale en anticorps monoclonaux de 4,5 X étant observée lorsque les cultures cuvées sont comparées. Cet écart au niveau des résultats expérimentaux est également observé avec les profils de concentrations en anticorps obtenus par simulation, une augmentation de 3,3 X étant observée cette fois-ci. Il est intéressant de noter que cette augmentation ne peut être uniquement attribuée qu'au changement des conditions initiales des équations différentielles du modèle (Tableau 3.1, mode cuvée). Les principales différences résident au niveau de la concentration initiale d'arginine, d'asparagine, d'aspartate, de glucose, de glutamine, d'isoleucine et de serine. Parmi ces métabolites (ou nutriments), le glucose et la glutamine ont été alimentés en excès en mode cuvée alimentée sans amélioration significative de la concentration en cellules viables ou en anticorps, ce qui suppose que ces métabolites n'expliquent pas ou peu l'amélioration entre les deux milieux. De plus, l'isoleucine et l'arginine sont peu consommés par les cellules (en mode cuvée avec le milieu Biogro-CHO, $1.5 \cdot 10^{-6}$ mmol. 10^{-6} cellules.h⁻¹ pour V_{HISARGTA} et $1.6 \cdot 10^{-6}$ mmol. 10^{-6} cellules.h⁻¹ pour V_{AAtoSUC} après 24 h) comparativement au métabolisme de l'aspartate et de l'asparagine ($10.6 \cdot 10^{-6}$ mmol. 10^{-6} cellules.h⁻¹ pour V_{ASTA} , $6.5 \cdot 10^{-6}$ mmol. 10^{-6} cellules.h⁻¹ pour V_{SDHH}), ces deux acides aminés se maintenant à des concentrations non limitantes, lorsque comparées à $K_{\text{mILEgrowth}}$ (0,01 mM) et $K_{\text{mARGgrowth}}$ (0,015 mM) respectivement. La différence est donc plus probablement due à une concentration accrue en aspartate, en

asparagine ou en serine dans le milieu PowerCHO-2 comparé au milieu Biogro-CHO. Les résultats obtenus semblent suggérer que la diminution en serine coïncide davantage avec la diminution de la croissance cellulaire dans ce cas-ci, mais davantage d'expérimentations doivent être exécutées afin d'approfondir ces résultats. Il est à noter toutefois que l'effet du milieu aura un impact indirect sur tous les flux métaboliques, et que des variables cruciales comme la croissance cellulaire et les niveaux énergétiques dépendent aussi bien des concentrations extracellulaires qu'intracellulaires. Un modèle dynamique est donc un outil intéressant pour comparer différents milieux de culture dans une optique d'optimisation.

Tableau 3.1: Compositions initiales des milieux de culture

Composé	Biogro-CHO (mM)	PowerCHO-2 (mM)
Alanine	1.0	0.7
Arginine	2.4	6.4
Asparagine	0.5	6.9
Aspartate	2.0	9.5
Glucose	26.0	43.0
Glutamine	3.7	6.0
Glutamate	0.8	0.8
Glycine	0.8	5.8
Histidine	0.9	0.9
Isoleucine	2.2	7.4
Lysine	2.1	5.7
Méthionine	0.4	1.7
Phénylalanine	1.1	1.0
Proline	0.7	2.3
Serine	0.8	8.9

Tableau 3.1 (suite): Compositions initiales des milieux de culture

Composé	Biogro-CHO (mM)	PowerCHO-2 (mM)
Thréonine	1.1	1.1
Tyrosine	0.7	1.0
Valine	1.3	1.2

3.2 Structure du modèle adaptée au mode cuvée alimentée

L'un des principaux objectifs de ce mémoire a été d'adapter le modèle métabolique des cellules CHO (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014) pour que celui-ci puisse s'appliquer adéquatement aux cultures en mode cuvée alimentée. Un seul ensemble de paramètres cinétiques a été utilisé afin de décrire l'ensemble des cultures effectuées. Le fait qu'un seul ensemble de paramètres puissent être utilisé, en raison du peu de différences significatives entre les paramètres décrivant les différentes cultures, semble indiquer que le modèle s'applique adéquatement à différentes conditions de culture, incluant le mode cuve-alimentée. Les mêmes ensembles de paramètres cinétiques ont aussi été utilisés par (P. Dorka, et al., 2009) et (Naderi, et al., 2011) pour représenter à la fois des cultures en mode cuvée et en mode cuvée alimentée. Malgré le fait que des valeurs uniques de paramètres soient utilisés, certaines différences sont observées entre les flux métaboliques en mode cuvée et en mode cuvée alimentée. Les différences sont plus évidentes toutefois au niveau des profils de concentrations intracellulaires et extracellulaires. Le modèle est donc capable de simuler différents profils uniquement en fonction des concentrations extracellulaires. La prochaine étape serait normalement de tester le modèle davantage en l'utilisant de manière prédictive, soit à l'extérieur de l'espace expérimental utilisé pour l'estimation de la valeur de ses paramètres. Selon les résultats expérimentaux et les simulations obtenues, de même que les nombreux résultats préliminaires recueillis de cultures en erlenmeyers (voir Annexe I), la lignée de cellules utilisées pour calibrer le modèle semble posséder un métabolisme bien régulé et ne démontre que peu de changements face aux différentes stratégies d'alimentation utilisées. En effet, bien que les résultats soient très différents lorsque des milieux distincts sont utilisés, il y a peu de changements au niveau des principales variables d'intérêt

(biomasse, anticorps) lorsque le mode cuvée alimentée est utilisé. On peut donc penser que le modèle serait capable de prédire de manière satisfaisante une large variété de stratégies d'alimentation si l'un des milieux connus était utilisé, bien que cela reste à démontrer. Toutefois, les conditions testées dans le cadre de ce mémoire n'ont jamais placé les cellules dans des conditions modifiant radicalement leur métabolisme. Tel que mentionné aux Chapitre 1 et 2, il est possible d'observer des cellules avec un métabolisme bien différent en contrôlant les niveaux de glucose et de glutamine à des niveaux près des conditions limitantes (Mulukutla, et al., 2012), ou en effectuant une substitution des nutriments utilisés pour l'alimentation (C. Altamirano, et al., 2006; C. Altamirano et al., 2001). L'utilisation de telles données expérimentales pour calibrer le modèle permettrait d'élargir l'horizon de prédiction du modèle et d'en tester les limites.

Afin d'adapter le modèle précédent (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014; Ghorbaniaghdam, et al., 2013; Ghorbaniaghdam, Henry, et al., 2014) à la lignée de CHO étudiée dans ce projet et d'en agrandir le champ d'applicabilité, certaines modifications ont été apportées afin de mieux représenter le mode cuvée alimentée. Les principales modifications apportées au modèle sont énumérées à la section 2.4.4. En particulier, certaines régulations métaboliques de la glycolyse ont été ajoutées. En mode cuvée alimentée, la principale limitation de la croissance et de la productivité des cultures est liée à l'accumulation de sous-produits métaboliques nocifs, en particulier le lactate et l'ammonium (Wlaschin, et al., 2006). En mode cuvée, l'effet de cette accumulation sur les principaux flux métaboliques et la croissance est difficile à isoler. En effet, l'effet de l'accumulation du lactate et de l'ammonium est souvent difficilement discernable de l'effet de l'épuisement des nutriments qui y sont associées, glucose et glutamine respectivement. L'utilisation de données expérimentales provenant de cultures en mode cuvée alimentée est donc nécessaire à cet égard. La concentration en lactate a atteint 49.4 mM et 54.8 mM pour le milieu Biogro-CHO et PowerCHO-2 respectivement contre 29.0 mM et 25.0 mM pour le milieu Biogro-CHO et PowerCHO-2 respectivement en mode cuvée. Pour ce qui est de la concentration en ammonium, 6.0 mM et 28.1 mM pour les milieux Biogro-CHO et PowerCHO-2 respectivement en mode cuvée alimentée contre 4.2 mM et 12.0 pour les milieux Biogro-CHO et PowerCHO-2 respectivement en mode cuvée. Dans les deux cas, les cultures en mode cuvée-alimentées sont beaucoup plus près ou dépassent les valeurs identifiés comme inhibantes pour la croissance par Xing et al (2008), soit 5.1 mM pour l'ammonium et 58 mM pour le lactate, que pour ce qui est du mode cuvée. (2008) Les différences de profils entre les modes cuvée et cuvée-alimentée, couplées

aux différences entre les profils de concentration des nutriments, permettraient donc de raffiner le modèle en précisant davantage le rôle de chacun pour décrire la croissance cellulaire et la production d'anticorps.

Dans l'optique de vouloir mieux modéliser les limitations inhérentes au mode cuvée alimentée, l'inhibition des réactions de la glycolyse V_{PFK} et V_{PK} par le lactate et l'alanine respectivement a été ajoutée au modèle. En outre, des termes d'inhibition en fonction de l'ammonium et du lactate ont été ajoutés à l'équation décrivant la croissance cellulaire. L'ajout de l'inhibition de la croissance par le lactate (P. Dorka, et al., 2009; Nolan, et al., 2011; Z. Z. Xing, et al., 2010) et de l'ammonium (Z. Z. Xing, et al., 2010) avait déjà été utilisé avec succès afin de modéliser la croissance en fonction des concentrations extracellulaires. De plus, les constantes d'affinités relatives aux différentes concentrations ont été découplées pour les flux métaboliques et les équations décrivant la croissance et la production d'anticorps. Cela a été possible à cause de la quantité de données expérimentales disponibles décrivant des cultures distinctes. L'hypothèse posée lorsque des valeurs ont été assignées aux constantes K_m , était que l'effet limitant était plus rapidement perceptible par rapport aux flux métaboliques que par rapport aux substrats. Cela fait en sorte que la croissance peut se poursuivre même lorsque l'un des nutriments est près de l'épuisement, par exemple l'asparagine dans le cas du milieu Biogro-CHO ou la glutamine dans le cas du milieu PowerCHO-2. Davantage d'essais, organisés sous forme de plans d'expériences fractionnels, permettraient d'estimer avec précision les valeurs de demi-saturation des concentrations extracellulaires relatives à la croissance. Pour ce qui est des concentrations intracellulaires, les constantes de Michaelis-Menten relatives à la croissance ($K_{mR5Pgrowth}$, $K_{mG6Pgrowth}$, $K_{mCITgrowth}$ et $K_{mATPgrowth}$) sont aussi distinctes des constantes relatives aux vitesses enzymatiques (K_{mR5P} , K_{mG6P} , K_{mCIT} et K_{mATP}). Dans ce cas-ci, toutefois, la relation est plus difficile à établir, car les concentrations intracellulaires varient très rapidement comparativement aux concentrations extracellulaires.

3.3 Validité du modèle

Afin de tester la validité du modèle et la validité des valeurs de paramètre proposées, il convient de s'attarder tout d'abord aux valeurs de paramètres obtenus après optimisation. À la Figure 2.2, il est possible de comparer graphiquement la valeur des 20 paramètres calculée à leur intervalle de confiance (premier point de la série). Lorsque toutes les expériences menées sont utilisées afin

d'optimiser les valeurs des paramètres, les intervalles de confiance (95 %) obtenus sont tous très étroits, exceptés pour la valeur de $V_{maxATPase}$, ce qui démontre une précision raisonnable sur les valeurs obtenues. De plus, cela indique que les paramètres identifiés au préalable étaient bien des paramètres sensibles qui influencent le résultat des simulations. Outre les résultats obtenus pour l'ensemble des cultures testées, les valeurs de paramètres et leurs intervalles de confiance (95 %) ont aussi été obtenus pour différents sous-ensembles de données expérimentales. Le fait que peu de différences significatives aient été observées par la suite semble indiquer que les valeurs obtenues s'appliquent à plusieurs types de cultures différentes.

Afin de valider les valeurs des paramètres, il serait possible de comparer ces paramètres cinétiques avec les valeurs de la littérature obtenues pour les différentes réactions biochimiques décrites par le modèle. Cette façon de faire est toutefois hasardeuse pour plusieurs raisons. Tout d'abord, pour plusieurs réactions comme c'est le cas pour V_{PFK} ou pour V_{SDH} , les réactions décrites par le modèle englobent une ou plusieurs réactions. De plus, certaines réactions comme V_{HK} ou V_{GlnT} tiennent compte de la vitesse de transport au travers de la membrane cellulaire. Ensuite, la littérature présente les paramètres cinétiques en conditions *in vitro*, alors que les résultats obtenus par simulations se déroulent en condition *in vivo*. Pour comparer les paramètres cinétiques obtenus *in vivo* de manière acceptable, il faudrait pouvoir comparer ces valeurs à un autre modèle cinétique *in vivo* semblable. Or, les valeurs des paramètres varient aussi selon la forme de l'équation. Advenant le cas où l'équation utilisée par notre modèle comprend des termes d'inhibition, d'activation ou inclut les cofacteurs dans la cinétique, il est fort probable que la comparaison ne sera plus valide. Pour ces raisons, afin de valider le modèle pour s'assurer que les valeurs sont dans des plages physiologiquement acceptables, il est plus pertinent de comparer les flux qui sont calculés à ceux obtenus dans la littérature tel qu'il a été le cas au Chapitre 2. Tel que démontré précédemment, il semble que les valeurs des principaux flux métaboliques calculées par le modèle soient compatibles avec les valeurs rapportées par la littérature (Ahn, et al., 2011; Provost, et al., 2006; Quek, et al., 2010; Sheikholeslami, et al., 2013; Templeton, et al., 2013) par l'analyse des flux métaboliques. Cela confirmerait du moins que les calculs des flux métaboliques fournissent des valeurs à tout le moins réalistes, sans prouver qu'elles sont précises.

Afin de réellement compléter la validation du modèle proposé, l'idéal serait de prouver les capacités prédictives de ce modèle. Cette tâche n'a malheureusement pu être accomplie dans le cadre du présent mémoire. La prochaine étape de validation serait donc d'utiliser le modèle pour

planifier une expérience, observer les résultats des simulations, réaliser l'expérience en laboratoire et comparer les résultats expérimentaux avec les résultats des simulations. Il est à noter que, pour que cette validation soit pertinente, il serait préférable que le modèle prédise des déviations importantes et facilement observables avec les résultats précédemment présentés au Chapitre 2. Le modèle constitue un outil unique pour planifier rapidement une grande quantité d'expériences différentes et d'en observer immédiatement (*in silico*) les effets attendus. L'identification d'une expérience utile à la validation avec le modèle ne devrait donc pas constituer un problème. De tels résultats permettraient de mesurer le degré de prédictibilité du modèle, et donc de sa pertinence en tant que plateforme de développement de bioprécédés.

CONCLUSION

L'objectif de ce mémoire était de proposer un modèle métabolique dynamique capable de prédire le comportement des cellules CHO selon les perturbations du milieu extérieur. Le but était de faire la démonstration qu'il était possible d'utiliser un tel type de modèle afin de comparer les performances et le métabolisme de ces cellules lorsqu'elles sont cultivées en utilisant diverses compositions de milieux de culture et lorsqu'une stratégie d'alimentation en nutriments est appliquée. Les expériences en bioréacteurs ont permis de fournir la base des résultats expérimentaux qui ont servi à la calibration du modèle, c'est-à-dire quatre cultures, deux en mode cuvée et deux en mode cuvée-alimentée, utilisant deux milieux de culture différents. Bien que l'utilisation du mode cuvée-alimentée n'a pas permis d'amélioration notable quant à la quantité d'anticorps monoclonaux produits, l'effet du milieu utilisé était bien visible. L'analyse de sensibilité des paramètres a permis d'identifier les paramètres critiques du modèle, qui indiquent que les paramètres liés à la croissance, la glycolyse et la régulation énergétique sont parmi les plus sensibles. L'optimisation des paramètres afin de diminuer l'erreur expérimentale a permis d'estimer les valeurs des paramètres et leur intervalle de confiance. Les résultats obtenus suggèrent que ces paramètres s'appliquent, peu importe le milieu utilisé ou le mode de culture des cellules. De plus, la nature dynamique du modèle permet de simuler adéquatement toutes les phases de croissance de la culture, un seul ensemble de paramètres s'appliquant à toutes ces phases. Le modèle présenté dans ce mémoire, en utilisant comme paramètres d'entrées les conditions initiales extracellulaires et intracellulaires et le détail de la stratégie d'alimentation, permet de modéliser un large éventail de situations. En outre, le modèle présenté modélise les flux métaboliques uniquement avec des équations cinétiques ayant des fondements mécanistiques et des mécanismes de régulation biochimiques connus, sans recours à des équations empiriques. L'analyse des résultats fournis par les simulations a permis de comparer les flux métaboliques et leur distribution. Le modèle a permis de représenter des différences au cours du temps pour les principaux flux métaboliques qui tendent à ralentir à mesure que la culture progresse. Globalement, les valeurs des flux métaboliques et leur distribution, ainsi que les valeurs des paramètres optimisés varient très peu (i.e. non significativement) entre les cultures à l'étude, ce qui indique la rigidité et l'efficacité du métabolisme de ces cellules. Le modèle s'applique bien à une variété de conditions de culture différentes et il a prouvé son utilité en décrivant deux milieux de culture dont la performance varie grandement.

RECOMMANDATIONS

Le travail effectué dans le cadre de ce mémoire de maîtrise a permis de développer et proposer un modèle métabolique dynamique en s'appuyant sur des données expérimentales issues de cultures cellulaires effectuées en laboratoire sous différentes conditions. Cependant, une des caractéristiques du modèle développé dans ce mémoire est que celui-ci peut produire des prédictions quant aux profils de concentrations des nutriments et des cellules viables sous de nouvelles conditions de culture. Cette caractéristique n'ayant pas été testée lors du présent travail, la suite logique de ce mémoire serait de tester les capacités prédictives du modèle. Tel que mentionné à la section 3.3, le modèle lui-même pourrait être utilisé afin de planifier la validation de sa capacité prédictive.

Un des principaux problèmes de ce travail lors la comparaison entre les modes cuvée et cuvée-alimentée est que l'utilisation du mode cuvée-alimentée n'a pas apporté d'avantage significatif, que ce soit relativement à la concentration finale en anticorps ou la quantité de cellules viables produites. Or, il existe de nombreux cas dans la littérature qui démontrent que, en utilisant une lignée cellulaire performante et une composition de milieu d'alimentation optimale, il est possible d'obtenir une augmentation appréciable de la production d'anticorps. Il serait donc plus intéressant d'utiliser le modèle afin de décrire des expériences qui produisent de tels résultats, et d'analyser les caractéristiques du métabolisme qui expliquent ces résultats que de décrire une stratégie d'alimentation qui n'est pas optimisée, puisque ultimement le but est de diriger les cellules vers un métabolisme optimal.

Enfin, la plus grande difficulté dans le développement de ce type de modèle, d'un point de vue expérimental, est d'obtenir une grande variété de mesures intracellulaires distinctes afin de raffiner le modèle, et ce, en fonction des concentrations extracellulaires. En effet, le mode d'échantillonnage utilisé nécessite une période relativement longue, et les états transitoires du métabolisme, en particulier en réponse à une perturbation externe, sont difficilement identifiables parce que trop courts. Une des méthodes afin de contourner ce problème pourrait être d'amener la culture en régime permanent en utilisant le mode continu de culture au lieu du mode cuvée-alimentée. Idéalement, de cette manière, il serait possible d'accroître notre contrôle sur la composition du milieu extracellulaire et les changements au niveau intracellulaire en régime permanent seraient plus facilement identifiables suite à ce changement.

BIBLIOGRAPHIE

- Abranches, R., Marcel, S., Arcalis, E., Altmann, F., Fevereiro, P., & Stoger, E. (2005). Plants as bioreactors: A comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. *Journal of Biotechnology*, 120(1), 121-134.
- Agrawal, V., Slivac, I., Perret, S., Bisson, L., St-Laurent, G., Murad, Y., et al. (2012). Stable Expression of Chimeric Heavy Chain Antibodies in CHO Cells. In D. Saerens & S. Muyldermans (Eds.), *Single Domain Antibodies* (Vol. 911, pp. 287-303): Humana Press.
- Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic Engineering*, 13(5), 598-609.
- Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2012). Towards dynamic metabolic flux analysis in CHO cell cultures. [Review]. *Biotechnology Journal*, 7(1), 61-74.
- Akhtar, K., Gupta, V., Koul, A., Alam, N., Bhat, R., & Bamezai, R. N. K. (2009). Differential Behavior of Missense Mutations in the Intersubunit Contact Domain of the Human Pyruvate Kinase M2 Isozyme. *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), 11971-11981.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., et al. (2004). *Essential Cell Biology*: Garland Science.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell 4th edition. In G. Science (Eds.) Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26907/>
- Altamirano, C., Berrios, J., Vergara, M., & Becerra, S. (2013). *Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production*.
- Altamirano, C., Illanes, A., Becerra, S., Cairo, J. J., & Godia, F. (2006). Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *Journal of Biotechnology*, 125(4), 547-556.
- Altamirano, C., Illanes, A., Casablancas, A., Gámez, X., Cairó, J. J., & Gòdia, C. (2001). Analysis of CHO Cells Metabolic Redistribution in a Glutamate-Based Defined Medium in Continuous Culture. *Biotechnology Progress*, 17(6), 1032-1041.
- Altamirano, C., Paredes, C., Illanes, A., Cairo, J. J., & Godia, F. (2004). Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *Journal of Biotechnology*, 110(2), 171-179.
- Antoniewicz, M. R. (2013). Dynamic metabolic flux analysis - tools for probing transient states of metabolic networks. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6), 973-978.
- Arora, M. (2013). Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods*.
- Bandaranayake, A. D., & Almo, S. C. (2014). Recent advances in mammalian protein production. *Febs Letters*, 588(2), 253-260.
- Bear, R., & Rintoul, D. (2014a, May 6). Oxidation of Pyruvate and the Krebs Cycle. *OpenStax CNX* Retrieved June 11, 2014, from <http://cnx.org/contents/e5dcf3b9-5307-4e9b-89fd-170682afbb6c@4>

- Bear, R., & Rintoul, D. (2014b, Mar 9). Oxidative Phosphorylation. *OpenStax-CNX* Retrieved June 4, 2014, from <http://cnx.org/content/m47335/1.6/>
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry 5th edition*: W H freeman.
- Bibila, T. A., Ranucci, C. S., Glazomitsky, K., Buckland, C., & Aunins, J. G. (1994). Monoclonal antibody process development using medium concentrates. *Biotechnology Progress*, 10(1), 87-96.
- Bibila, T. A., & Robinson, D. K. (1995). In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. *Biotechnol Prog*, 11(1), 1-13.
- Birch, J. R., & Racher, A. J. (2006). Antibody production. [Review]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(5-6), 671-685.
- Boghigian, B. A., Seth, G., Kiss, R., & Pfeifer, B. A. (2010). Metabolic flux analysis and pharmaceutical production. *Metabolic Engineering*, 12(2), 81-95.
- Butler, M. (2005). Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. [Review]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(3), 283-291.
- Carinhas, N., Duarte, T. M., Barreiro, L. C., Carrondo, M. J. T., Alves, P. M., & Teixeira, A. P. (2013). Metabolic signatures of GS-CHO cell clones associated with butyrate treatment and culture phase transition. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(12), 3244-3257.
- Caro, L. G. (1970). Chromosome replication in *Escherichia coli*: III. Segregation of chromosomal strands in multi-forked replication. *Journal of Molecular Biology*, 48(2), 329-338.
- Castro, P. M., Hayter, P. M., Ison, A. P., & Bull, A. T. (1992). Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 84-90.
- Chassagnole, C., Noisommit-Rizzi, N., Schmid, J. W., Mauch, K., & Reuss, M. (2002). Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. [Article]. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(1), 53-73.
- Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C., & Gek Sim Yap, M. (2005a). Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(2), 164-177.
- Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C., & Gek Sim Yap, M. (2005b). Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(2), 164-177.
- Cherlet, M., & Marc, A. (1999). Hybridoma cell behaviour in continuous culture under hyperosmotic stress. *Cytotechnology*, 29(1), 71-84.
- Chong, W. P., Thng, S. H., Hiu, A. P., Lee, D. Y., Chan, E. C., & Ho, Y. S. (2012). LC-MS-based metabolic characterization of high monoclonal antibody-producing Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, 109(12), 3103-3111.

- Clincke, M. F., Molleryd, C., Samani, P. K., Lindskog, E., Faldt, E., Walsh, K., et al. (2013). Very high density of Chinese hamster ovary cells in perfusion by alternating tangential flow or tangential flow filtration in WAVE Bioreactor-part II: Applications for antibody production and cryopreservation. *Biotechnol Prog*, 29(3), 768-777.
- Cloutier, M., Bouchard-Marchand, E., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2008). A predictive nutritional model for plant cells and hairy roots. *Biotechnol Bioeng*, 99(1), 189-200.
- Cloutier, M., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2007). Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism. [Article]. *Phytochemistry*, 68(16-18), 2393-2404.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), 3240-3244.
- Costa Leite, T., Da Silva, D., Guimaraes Coelho, R., Zancan, P., & Sola-Penna, M. (2007). Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochem J*, 408(1), 123-130.
- Cruz, H. J., Freitas, C. M., Alves, P. M., Moreira, J. L., & Carrondo, M. J. T. (2000). Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. [Article]. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1-2), 43-52.
- Cruz, H. J., Moreira, J. L., & Carrondo, M. J. T. (2000). Metabolically optimised BHK cell fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 80(2), 109-118.
- Dash, R. K., Li, Y. J., Kim, J., Saidel, G. M., & Cabrera, M. E. (2008). Modeling cellular metabolism and energetics in skeletal muscle: Large-scale parameter estimation and sensitivity analysis. *Ieee Transactions on Biomedical Engineering*, 55(4), 1298-1318.
- De Tremblay, M., Perrier, M., Chavarie, C., & Archambault, J. (1992). Optimization of fed-batch culture of hybridoma cells using dynamic programming: single and multi feed cases. *Bioprocess Engineering*, 7(5), 229-234.
- de Tremblay, M., Perrier, M., Chavarie, C., & Archambault, J. (1993). Fed-batch culture of hybridoma cells: comparison of optimal control approach and closed loop strategies. *Bioprocess Engineering*, 9(1), 13-21.
- Dean, J., & Reddy, P. (2013). Metabolic analysis of antibody producing CHO cells in fed-batch production. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(6), 1735-1747.
- Deo, Y. M., Mahadevan, M. D., & Fuchs, R. (1996). Practical considerations in operation and scale-up of spin-filter based bioreactors for monoclonal antibody production. *Biotechnol Prog*, 12(1), 57-64.
- deZengotita, V. M., Miller, W. M., Aunins, J. G., & Zhou, W. C. (2000). Phosphate feeding improves high-cell-concentration NS0 myeloma culture performance for monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 69(5), 566-576.
- Dinnis, D. M., & James, D. C. (2005). Engineering mammalian cell factories for improved recombinant monoclonal antibody production: lessons from nature? *Biotechnol Bioeng*, 91(2), 180-189.
- Dorka, P. (2007). *Modelling batch and fed-batch mammalian cell cultures for optimizing MAb productivity*. Unpublished M.A.Sc., University of Waterloo (Canada), Ann Arbor.

- Dorka, P., Fischer, C., Budman, H., & Scharer, J. (2009). Metabolic flux-based modeling of mAb production during batch and fed-batch operations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(2), 183-196.
- Eibl, D., Eibl, R., & Pörtner, R. (2009). Mammalian cell culture technology: an emerging field *Cell and Tissue Reaction Engineering* (pp. 3-11): Springer.
- Europa, A. F., Gambhir, A., Fu, P. C., & Hu, W. S. (2000). Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(1), 25-34.
- Fan, L., Zhao, L., Sun, Y., Kou, T., Zhou, Y., & Tan, W.-S. (2009). A high-yielding, generic fed-batch process for recombinant antibody production of GS-engineered cell lines. *Journal of microbiology and biotechnology*, 19(12), 1695-1702.
- Fell, D. A. (1998). Increasing the flux in metabolic pathways: A metabolic control analysis perspective. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(2-3), 121-124.
- Fike, R. (2009). Nutrient Supplementation Strategies for Bioharmaceutical Production, Part 2. [Review]. *Bioprocess International*, 7(11), 46-52.
- Fox, S. R., Patel, U. A., Yap, M. G. S., & Wang, D. I. C. (2004). Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: Experimental and modeling. [Article]. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(2), 177-184.
- Gagnon, M., Hiller, G., Luan, Y.-T., Kittredge, A., DeFelice, J., & Drapeau, D. (2011). High-End pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO Fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(6), 1328-1337.
- Gao, J. Y., Gorenflo, V. M., Scharer, J. M., & Budman, H. M. (2007). Dynamic metabolic modeling for a MAB bioprocess. [Article]. *Biotechnology Progress*, 23(1), 168-181.
- Gerngross, T. U. (2004). Corrigendum: Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1589.
- Ghorbaniaghdam, A., Chen, J., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). Analyzing Clonal Variation of Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell Lines Using an In Silico Metabolomic Platform. *Plos One*, 9(3).
- Ghorbaniaghdam, A., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2013). A kinetic-metabolic model based on cell energetic state: study of CHO cell behavior under Na-butyrate stimulation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(4), 469-487.
- Ghorbaniaghdam, A., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). An in-silico study of the regulation of CHO cells glycolysis. *Journal of Theoretical Biology*, 357(0), 112-122.
- Glacken, M. W. (1988). Catabolic control of mammalian cell culture. *Nature Biotechnology*, 6(9), 1041-1050.
- Glacken, M. W., Huang, C., & Sinskey, A. J. (1989). MATHEMATICAL DESCRIPTIONS OF HYBRIDOMA CULTURE KINETICS .3. SIMULATION OF FED-BATCH BIOREACTORS. *Journal of Biotechnology*, 10(1), 39-65.

- Goudar, C., Biener, R., Boisart, C., Heidemann, R., Piret, J., de Graaf, A., et al. (2010). Metabolic flux analysis of CHO cells in perfusion culture by metabolite balancing and 2D C-13, H-1 COSY NMR spectroscopy. *Metabolic Engineering*, 12(2), 138-149.
- Hacker, D. L., De Jesus, M., & Wurm, F. M. (2009). 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells — Where do we go from here? *Biotechnology Advances*, 27(6), 1023-1027.
- Hardie, D. G., & Hawley, S. A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays*, 23(12), 1112-1119.
- Herwig, C., & von Stockar, U. (2002). A small metabolic flux model to identify transient metabolic regulations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24(6), 395-403.
- Hinkle, P. C. (2005). P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1706(1-2), 1-11.
- Irani, N., Wirth, M., van Den Heuvel, J., & Wagner, R. (1999). Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnol Bioeng*, 66(4), 238-246.
- Izyumov, D. S., Avetisyan, A. V., Pletjushkina, O. Y., Sakharov, D. V., Wirtz, K. W., Chernyak, B. V., et al. (2004). "Wages of Fear": transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1658(1-2), 141-147.
- Jang, J. D., & Barford, J. P. (2000). An unstructured kinetic model of macromolecular metabolism in batch and fed-batch cultures of hybridoma cells producing monoclonal antibody. *Biochemical engineering journal*, 4(2), 153-168.
- Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R., & Brand, M. D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in Biochemistry*, 47, 53-67.
- Jayapal, K. R., Wlaschin, K. F., Hu, W. S., & Yap, M. G. S. (2007). Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, 103(10), 40-47.
- Jefferis, R. (2005). Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics. *Biotechnology Progress*, 21(1), 11-16.
- Jing, M., & Ismail-Beigi, F. (2007). Critical role of 5'-AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in response to inhibition of oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(1), 30.
- Jones, S. D., Castillo, F. J., & Levine, H. L. (2007). Advances in the development of therapeutic monoclonal antibodies. *Biopharm international*, 20(10).
- Kaufman, R. J., Wasley, L. C., Spiliotes, A. J., Gossels, S. D., Latt, S. A., Larsen, G. R., et al. (1985). Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells. *Molecular and cellular biology*, 5(7), 1750-1759.
- Kelley, B. (2009). Industrialization of mAb production technology The bioprocessing industry at a crossroads. *Mabs*, 1(5), 443-452.

- Kim, J. Y., Kim, Y. G., & Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 917-930.
- Kim, S. H., & Lee, G. M. (2007). Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74(1), 152-159.
- Kruger, N. J., & von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 236-246.
- Lee, Y. Y., Yap, M. G. S., Hu, W.-S., & Wong, K. T. K. (2003). Low-Glutamine Fed-Batch Cultures of 293-HEK Serum-Free Suspension Cells for Adenovirus Production. *Biotechnology Progress*, 19(2), 501-509.
- Leite, T. C., Coelho, R. G., Da Silva, D., Coelho, W. S., Marinho-Carvalho, M. M., & Solapenna, M. (2011). Lactate downregulates the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase in diverse tissues from mice. *Febs Letters*, 585(1), 92-98.
- Lequeux, G., Beauprez, J., Maertens, J., Van Horen, E., Soetaert, W., Vandamme, E., et al. (2010). Dynamic metabolic flux analysis demonstrated on cultures where the limiting substrate is changed from carbon to nitrogen and vice versa. *BioMed Research International*, 2010.
- Li, L., Mi, L., Feng, Q., Liu, R., Tang, H., Xie, L., et al. (2005). Increasing the culture efficiency of hybridoma cells by the use of integrated metabolic control of glucose and glutamine at low levels. *Biotechnol Appl Biochem*, 42(Pt 1), 73-80.
- Li, Y., Rivera, D., Ru, W., Gunasekera, D., & Kemp, R. G. (1999). Identification of allosteric sites in rabbit phosphofructo-1-kinase. *Biochemistry*, 38(49), 16407-16412.
- Llaneras, F., & Pico, J. (2007). A procedure for the estimation over time of metabolic fluxes in scenarios where measurements are uncertain and/or insufficient. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 421.
- Llorente, P., Marco, R., & Sols, A. (1970). Regulation of liver pyruvate kinase and the phosphoenolpyruvate crossroads. *European Journal of Biochemistry*, 13(1), 45-54.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Molecular Cell Biology 4th edition. In W. H. Freeman (Eds.) Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>
- Ma, J. K. C., Drake, P. M. W., & Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews. Genetics*, 4(10), 794-805.
- Macheda, M. L., Rogers, S., & Best, J. D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 202(3), 654-662.
- Mahadevan, R., Edwards, J. S., & Doyle, F. J. (2002). Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in Escherichia coli. *Biophysical Journal*, 83(3), 1331-1340.
- Mahr, J. (2013, November 4). Cell Energy: Glycolysis. *OpenStax CNX* Retrieved June 11, 2014, from <http://cnx.org/contents/3098bc50-e285-499d-9ac3-11344235956b@1>.

- Mailier, J., Delmotte, A., Cloutier, M., Jolicoeur, M., & Vande Wouwer, A. (2011). Parametric sensitivity analysis and reduction of a detailed nutritional model of plant cell cultures. *Biotechnol Bioeng*, 108(5), 1108-1118.
- Maranga, L., & Goochee, C. F. (2006). Metabolism of PER.C6 cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels. *Biotechnol Bioeng*, 94(1), 139-150.
- Marín-Hernández, A., Rodríguez-Enríquez, S., Vital-González, P. A., Flores-Rodríguez, F. L., Macías-Silva, M., Sosa-Garrocho, M., et al. (2006). Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. *Febs Journal*, 273(9), 1975-1988.
- Martínez, V. S., Dietmair, S., Quek, L.-E., Hodson, M. P., Gray, P., & Nielsen, L. K. (2013). Flux balance analysis of CHO cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(2), 660-666.
- Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E., Rodríguez-Enríquez, S., & Olín-Sandoval, V. (2008). Metabolic control analysis: a tool for designing strategies to manipulate metabolic pathways. *BioMed Research International*, 2008.
- Morris, M. D. (1991). Factorial sampling plans for preliminary computational experiments. *Technometrics*, 33(2), 161-174.
- Mulukutla, B. C., Gramer, M., & Hu, W.-S. (2012). On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells. *Metabolic Engineering*, 14(2), 138-149.
- Mulukutla, B. C., Khan, S., Lange, A., & Hu, W.-S. (2010). Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends in Biotechnology*, 28(9), 476-484.
- Naderi, S., Meshram, M., Wei, C., McConkey, B., Ingalls, B., Budman, H., et al. (2011). Development of a mathematical model for evaluating the dynamics of normal and apoptotic Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Progress*, 27(5), 1197-1205.
- Niklas, J., Schröder, E., Sandig, V., Noll, T., & Heinzle, E. (2011). Quantitative characterization of metabolism and metabolic shifts during growth of the new human cell line AGE1.HN using time resolved metabolic flux analysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(5), 533-545.
- Niu, H., Amribt, Z., Fickers, P., Tan, W., & Bogaerts, P. (2013). Metabolic pathway analysis and reduction for mammalian cell cultures—Towards macroscopic modeling. *Chemical Engineering Science*, 102(0), 461-473.
- Nolan, R. P., & Lee, K. (2011). Dynamic model of CHO cell metabolism. *Metabolic Engineering*, 13(1), 108-124.
- Nyberg, G. B., Balcarcel, R. R., Follstad, B. D., Stephanopoulos, G., & Wang, D. I. C. (1999). Metabolism of peptide amino acids by Chinese hamster ovary cells grown in a complex medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(3), 324-335.
- Ogawa, T., Mori, H., Tomita, M., & Yoshino, M. (2007). Inhibitory effect of phosphoenolpyruvate on glycolytic enzymes in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 158(2), 159-163.
- Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. O. (2010). What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology*, 28(3), 245-248.

- Ozturk, S. S., Riley, M. R., & Palsson, B. O. (1992). Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 39(4), 418-431.
- Parampalli, A., Eskridge, K., Smith, L., Meagher, M., Mowry, M., & Subramanian, A. (2007). Development of serum-free media in CHO-DG44 cells using a central composite statistical design. *Cytotechnology*, 54(1), 57-68.
- Poliquin, P. O., Chen, J., Cloutier, M., Trudeau, L.-É., & Jolicoeur, M. (2013). Metabolomics and In-Silico Analysis Reveal Critical Energy Deregulations in Animal Models of Parkinson's Disease. *Plos One*, 8(7), e69146.
- Porro, D., Gasser, B., Fossati, T., Maurer, M., Branduardi, P., Sauer, M., et al. (2011). Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 939-948.
- Prescher, J. A., & Bertozzi, C. R. (2005). Chemistry in living systems. *Nature Chemical Biology*, 1(1), 13-21.
- Provost, A., & Bastin, G. (2004). Dynamic metabolic modelling under the balanced growth condition. *Journal of Process Control*, 14(7), 717-728.
- Provost, A., Bastin, G., Agathos, S. N., & Schneider, Y. J. (2006). Metabolic design of macroscopic bioreaction models: application to Chinese hamster ovary cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29(5-6), 349-366.
- Quek, L.-E., Dietmair, S., Krömer, J. O., & Nielsen, L. K. (2010). Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metabolic Engineering*, 12(2), 161-171.
- Rodrigues, M. E., Costa, A. R., Henriques, M., Azeredo, J., & Oliveira, R. (2010). Technological progresses in monoclonal antibody production systems. *Biotechnol Prog*, 26(2), 332-351.
- Ryu, D. D. Y., & Furusaki, S. (1994). *Advances in Plant Biotechnology*: Elsevier Science.
- Sandadi, S., Ensari, S., & Kearns, B. (2006). Application of Fractional Factorial Designs to Screen Active Factors for Antibody Production by Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology Progress*, 22(2), 595-600.
- Segel, I. H. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systemes*: John Wiley & Sons.
- Sellick, C. A., Croxford, A. S., Maqsood, A. R., Stephens, G., Westerhoff, H. V., Goodacre, R., et al. (2011). Metabolite Profiling of Recombinant CHO Cells: Designing Tailored Feeding Regimes That Enhance Recombinant Antibody Production. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(12), 3025-3031.
- Selvarasu, S., Ho, Y. S., Chong, W. P. K., Wong, N. S. C., Yusufi, F. N. K., Lee, Y. Y., et al. (2012). Combined in silico modeling and metabolomics analysis to characterize fed-batch CHO cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(6), 1415-1429.
- Sen, S., & Roychoudhury, P. K. (2013). Development of optimal medium for production of commercially important monoclonal antibody 520C9 by hybridoma cell. *Cytotechnology*, 65(2), 233-252.

- Sengupta, N., Rose, S. T., & Morgan, J. A. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cell metabolism in the late non-growth phase. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(1), 82-92.
- Shade, K.-T., & Anthony, R. (2013). Antibody Glycosylation and Inflammation. *Antibodies*, 2(3), 392-414.
- Sheikh, K., Forster, J., & Nielsen, L. K. (2005). Modeling hybridoma cell metabolism using a generic genome-scale metabolic model of *Mus musculus*. *Biotechnol Prog*, 21(1), 112-121.
- Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., & Henry, O. (2013). Probing the metabolism of an inducible mammalian expression system using extracellular isotopomer analysis. [Article]. *Journal of Biotechnology*, 164(4), 469-478.
- Shuler, M. L., & Kargi, F. (1992). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*: Prentice Hall.
- Sidoli, F. R., Mantalaris, A., & Asprey, S. P. (2004). Modelling of mammalian cells and cell culture processes. *Cytotechnology*, 44(1-2), 27-46.
- Sin, G., Gernaey, K. V., & Lantz, A. E. (2009). Good modeling practice for PAT applications: propagation of input uncertainty and sensitivity analysis. *Biotechnol Prog*, 25(4), 1043-1053.
- Spens, E., & Haggstrom, L. (2007). Defined protein and animal component-free NSO fed-batch culture. [Article]. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(6), 1183-1194.
- Stephanopoulos, G. (1999). Metabolic Fluxes and Metabolic Engineering. [Article]. *Metabolic Engineering*, 1(1), 1-11.
- Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A., & Nielsen, J. (1998). *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. San Diego: Academic PRes.
- Templeton, N., Dean, J., Reddy, P., & Young, J. D. (2013). Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(7), 2013-+.
- Tjio, J. H., & Puck, T. T. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J Exp Med*, 108(2), 259-268.
- Valancin, A., Srinivasan, B., Rivoal, J., & Jolicoeur, M. (2013). Analyzing the effect of decreasing cytosolic triosephosphate isomerase on *Solanum tuberosum* hairy root cells using a kinetic–metabolic model. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(3), 924-935.
- Vallino, J., & Stephanopoulos, G. (1990). Flux determination in cellular bioreaction networks: applications to lysine fermentations. *Frontiers in bioprocessing*, 1, 205-219.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033.
- Waldmann, T. A. (2003). Immunotherapy: past, present and future. *Nature Medicine*, 9(3), 269-277.
- Walsh, G. (2010). Biopharmaceutical benchmarks 2010. [Article]. *Nature Biotechnology*, 28(9), 917-924.

- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314.
- Wlaschin, K., & Hu, W.-S. (2006). Fedbatch Culture and Dynamic Nutrient Feeding. In W.-S. Hu (Ed.), *Cell Culture Engineering* (Vol. 101, pp. 43-74): Springer Berlin Heidelberg.
- Wolfson, W. (2013). Grow Your Own: Protalix BioTherapeutics Produces Drugs in Carrot Cells. *Chemistry and Biology*, 20(8), 969-970.
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. [Review]. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1393-1398.
- Xie, L., Nyberg, G., Gu, X., Li, H., Möllborn, F., & Wang, D. I. C. (1997). Gamma-interferon production and quality in stoichiometric fed-batch cultures of Chinese hamster ovary (CHO) cells under serum-free conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 56(5), 577-582.
- Xie, L., & Wang, D. I. (1994a). Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor. *Cytotechnology*, 15(1-3), 17-29.
- Xie, L., & Wang, D. I. (1994b). Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(11), 1175-1189.
- Xing, Z., Li, Z., Chow, V., & Lee, S. S. (2008). Identifying inhibitory threshold values of repressing metabolites in CHO cell culture using multivariate analysis methods. *Biotechnol Prog*, 24(3), 675-683.
- Xing, Z. Z., Bishop, N., Leister, K., & Li, Z. J. (2010). Modeling Kinetics of a Large-Scale Fed-Batch CHO Cell Culture by Markov Chain Monte Carlo Method. *Biotechnology Progress*, 26(1), 208-219.
- Xing, Z. Z., Li, Z. J., Chow, V., & Lee, S. S. (2008). Identifying inhibitory threshold values of repressing metabolites in CHO cell culture using multivariate analysis methods. *Biotechnology Progress*, 24(3), 675-683.
- Xu, X., Nagarajan, H., Lewis, N. E., Pan, S. K., Cai, Z. M., Liu, X., et al. (2011). The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nature Biotechnology*, 29(8), 735-U131.
- Yang, Z., & Xiong, H.-R. (2012). Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells. In L. Ceccherini-Nelli (Ed.), *Biomedical Tissue Culture*: InTech.
- Yoon, S. K., Song, J. Y., & Lee, G. M. (2003). Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in chinese hamster ovary cells. [Article]. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(3), 289-298.
- Zhang, H., Wang, H., Liu, M., Zhang, T., Zhang, J., Wang, X., et al. (2013). Rational development of a serum-free medium and fed-batch process for a GS-CHO cell line expressing recombinant antibody. *Cytotechnology*, 65(3), 363-378.
- Zhang, J. (2010). Mammalian Cell Culture for Biopharmaceutical Production. In R. Baltz, J. Davies & A. Demain (Eds.), *Manual of Microbiology and Biotechnology, Third Edition* (pp. 157-178). Washington, DC: American Society of Microbiology.

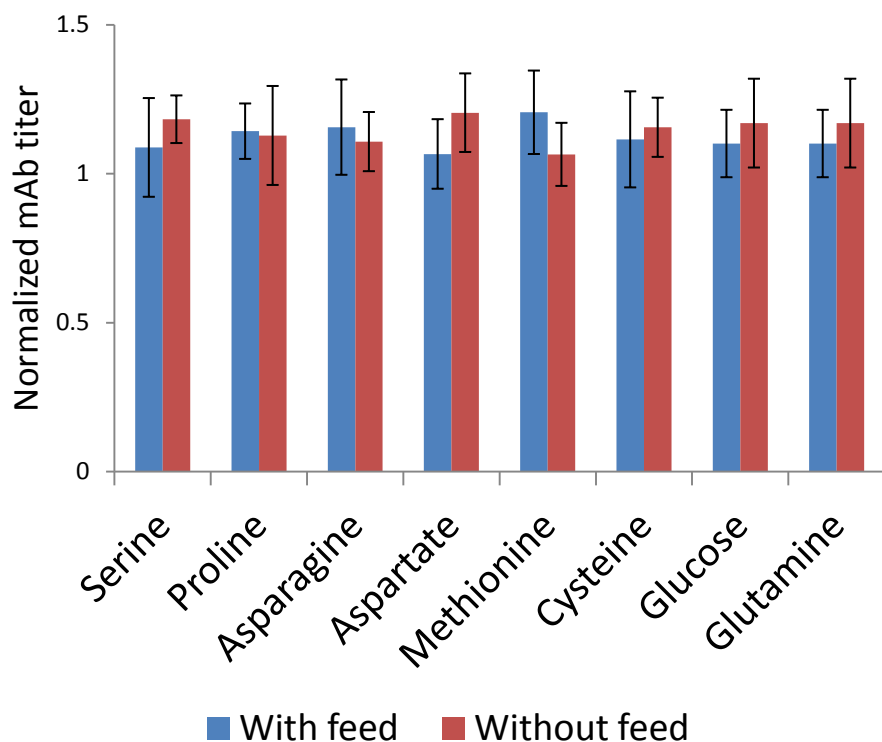
- Zheng, K., Bantog, C., & Bayer, R. (2011). The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *Mabs*, 3(6), 568-576.
- Zhou, W., Rehm, J., Europa, A., & Hu, W. S. (1997). Alteration of mammalian cell metabolism by dynamic nutrient feeding. *Cytotechnology*, 24(2), 99-108.
- Zhu, M. M., Goyal, A., Rank, D. L., Gupta, S. K., Vanden Boom, T., & Lee, S. S. (2005). Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study. *Biotechnol Prog*, 21(1), 70-77.

ANNEXE A – EFFET DE L'AJOUT DE DIFFÉRENTS NUTRIMENTS SUR LA CONCENTRATION FINALE EN ANTICORPS

Effet de l'ajout de différents nutriments sur la concentration finale en mAb

Nutriment	Effet sur la concentration finale en mAb (mg L ⁻¹)	1- <i>p</i>
Serine	-0.95	0.61
Proline	0.14	0.11
Asparagine	0.56	0.39
Aspartate	-1.39	0.78
Methionine	1.42	0.79
Cysteine	-0.41	0.29
Glucose	-0.69	0.47
Glutamine	-0.07	0.05

Les résultats ont été obtenus par une série de 16 culture en mode cuvée en erlenmeyers où l'ajout des nutriments a été effectué selon un plan expérimental fractionnel de 16 essais afin d'en dégager les effets principaux. Les nutriments ont été ajouté de manière à combler leur consommation (selon les données en bioréacteur en mode cuvée avec le milieu Biogro-CHO), et les nutriments sélectionnés pour l'alimentation, dans chaque culture, l'ont été par le plan expérimental. L'effet sur la concentration finale en mAb a été calculé par régression linéaire en tenant compte de toutes les expériences et ne tient compte d'aucune interaction. La valeur de 1-*p* représente la probabilité que l'effet soit différent de 0. En considérant 95% de confiance, aucun des effets testés n'est significatif.



Effet de l'ajout de différents nutriments sur la concentration finale en mAb

Ces résultats ont été obtenus en traitant les mêmes données expérimentales qu'au tableau précédent. Ils représentent une comparaison graphique de la moyenne de la concentration finale en mAb obtenue avec ou sans l'ajout d'un nutriment spécifique. L'intervalle de confiance de 95 % est représenté. La valeur de 1 représente la concentration finale en anticorps du groupe contrôle.